UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

FACULTÉ DE MÉDECINE N° 60

# RECHERCHES HISTOCHIMIQUES et HISTOPHYSIOLOGIQUES sur le FOIE HUMAIN NORMAL et PATHOLOGIQUE PRÉLEVÉ par PONCTION-BIOPSIE

Travail du laboratoire de Pathologie Générale *(Professeur P. Pagès)*
et du Centre Régional de Transfusion Sanguine *(Professeur P. Cazal)*

## THÈSE

*présentée et publiquement soutenue devant*
LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MONTPELLIER
le 16 JUIN 1952

par

Jean MACARY

*né le 26 juin 1920 à PERPIGNAN (P.-O.)*
Diplômé de Biologie supérieure
(Mention Anatomie Pathologique et mention Microbiologie)
Pharmacien — Licencié ès-Sciences
Chef de Laboratoire à la Faculté de Médecine

*en vue d'obtenir le grade de* DOCTEUR en MÉDECINE

Examinateurs de la Thèse

MM. P. PAGÈS, Professeur, *Président.*
J. TURCHINI, Professeur
L. CARRÈRE, Professeur
P. CAZAL, Agrégé

*Assesseurs*

IMPRIMERIE
CARLIER - SAUMADE
2, RUE DU CYGNE, 2
MONTPELLIER
- - 1953 - -

1953

# RECHERCHES
# HISTOCHIMIQUES ET HISTOPHYSIOLOGIQUES
# SUR LE
# FOIE HUMAIN NORMAL ET PATHOLOGIQUE
# PRÉLEVÉ PAR PONCTION-BIOPSIE

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

FACULTÉ DE MÉDECINE N° 60

# RECHERCHES HISTOCHIMIQUES et HISTOPHYSIOLOGIQUES sur le FOIE HUMAIN NORMAL et PATHOLOGIQUE PRÉLEVÉ par PONCTION-BIOPSIE

Travail du laboratoire de Pathologie Générale *(Professeur P. Pagès)*
et du Centre Régional de Transfusion Sanguine *(Professeur P. Cazal)*

## THÈSE

*présentée et publiquement soutenue devant*
LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MONTPELLIER
le 16 JUIN 1952

par

Jean MACARY

*né le 26 juin 1920 à PERPIGNAN (P.-O.)*

Diplômé de Biologie supérieure
(Mention Anatomie Pathologique et mention Microbiologie)
Pharmacien — Licencié ès-Sciences
Chef de Laboratoire à la Faculté de Médecine

*en vue d'obtenir le grade de* DOCTEUR en MÉDECINE

Examinateurs de la Thèse : MM. P. PAGÈS, Professeur, *Président.*
J. TURCHINI, Professeur
L. CARRÈRE, Professeur
P. CAZAL, Agrégé
*Assesseurs*

IMPRIMERIE
CARLIER " SAUMADE
2, RUE DU CYGNE, 2
MONTPELLIER
" " 1953 " "

# PERSONNEL DE LA FACULTÉ

## Professeurs

| *Cahires :* | MM. |
|---|---|
| Anatomie ..... | Laux |
| Histologie ..... | Turchini |
| Physiologie ..... | Hédon |
| Physiol. appliq. . | Loubatières |
| Chimie biol. méd. et toxicol. .... | Cristol |
| Physique méd. .. | Pech |
| Anat. path. et méd. expér. ... | Baumel |
| Microbiologie ... | Carrère |
| Hist. nat. méd. par. et méd. exo. | Harant |
| Path. et thér. gén. | Pagès |
| Thér. et clin. des mal. infect. .... | Janbon |
| Hydrol. thér. et climat. ..... | Bert |
| Hygiène ..... | Carrieu |
| Méd. lég. et méd. soc. ..... | Fourcade |
| Tech. opér. et chir. expér. ... | Lapeyrie |
| Path. et clin. prop chir. ..... | Mourgue-Molines |
| Path. et clin. prop. méd..... | Puech |
| Clinique méd. .. | Giraud, *doyen* |
| Clinique méd. .. | Boulet |
| Clinique chir. ... | Lapeyrie |
| Clinique chir. ... | Aimes |
| Clin. obstétricale . | Caderas de Kerleau |
| Clin. des mal. ment. et nerv... | Lafon |
| Clin. des mal. des enf. et hyg. du 1er âge ..... | Chaptal |
| Clin. de dermato-syphilig..... | Margarot |
| Clin. chir. et inf. et orth. ..... | Étienne |
| Clin. urologique . | Truc |
| Clin. gynéc. .... | Roux |
| Clin. ophtalm. .. | Dejean |
| Clin. d'oto-rhino-lar. et chir. max.-faciale ..... | Terracol |
| Clin. de la tub. . | Vidal |
| Électro-radiologie | Lamarque |

*Professorat à titre personnel :*

Histol. et emb. . Granel

*Chargé de cours :*

Prop. méd. ..... P. Rimbaud

## Professeurs honoraires

MM. Galavielle, Vires, Villard, Grynfeltt, Riche, L. Rimbaud, Boudet, Euzière, J. Delmas.

## Chargés d'enseignements complémentaires

| MM. | |
|---|---|
| Chimie ..... | Bénézech, *m. de c. agr.* |
| Anatomie pathol.. | Cazal, *agrégé.* |
| Pharmacologie .. | Harant, *prof.* |
| Pharm. et thér... | Serre, *agrégé.* |
| Pathol. expérim. | Passouant, *m. de c. agr.* |
| Thérapeutique .. | Passouant, *m. de c. agr.* |
| Pathol. médicale . | Boucomont, *ag. libre.* |
| — — | Serre, *agrégé.* |

| MM. | |
|---|---|
| Path. respiratoire | Balmès, *agrégé.* |
| Neuro-chirurgie . | Gros, *agrégé.* |
| Chir. de la tub. .. | Mourgue-Molines, *professeur.* |
| Clin. gast-ent. ... | Baumel, *prof.* |
| Pathologie chir. . | Joyeux. *agrégé.* |
| — — | Nègre, *agrégé.* |
| Obstetrique ..... | Coll de Carrera, *agrégé libre.* |

## Maîtres de conférences et agrégés en exercice

| MM. | |
|---|---|
| Chimie ..... | Bénézech, *m. de c. agr.* |
| Microbiologie ... | Renoux, *m. de c. agr.* |
| Médecine ..... | Serre. |
| — ..... | Balmès. |

| MM. | |
|---|---|
| Médecine ..... | Cazal, *m. de c. agr.* |
| Médecine expér... | Passouant, *m. de c. ag.* |
| Chirurgie ..... | Joyeux. |
| — ..... | Nègre. |
| Neuro-chirurgie . | Gros. |

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

*dont les conseils m'ont si souvent manqué.*
*Cette thèse est l'accomplissement de son désir.*

A MA MÈRE

*dont l'inlassable dévouement me permit de mener à bien ces études.*
*Modeste témoignage de mon immense amour.*

J. M.

A TOUS MES MAITRES
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
DE LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE
QUI ONT CONTRIBUÉ A MA FORMATION
DE BIOLOGISTE

J. M.

# RECHERCHES HISTOCHIMIQUES ET HISTOPHYSIOLOGIQUES SUR LE FOIE HUMAIN NORMAL ET PATHOLOGIQUE PRÉLEVÉ PAR PONCTION-BIOPSIE

## INTRODUCTION

Depuis les études morphologiques déjà anciennes et devenues classiques des histologistes des cinquante dernières années, il semblait que tout avait été dit en ce qui concerne le foie humain.

L'introduction en clinique en 1939 par Iversen et Roholm de la ponction-biopsie du foie, devait amener de telles révélations que l'histopathologie hépatique doit être désormais envisagée sous un jour nouveau. Grâce à la forte impulsion donnée par M. le Professeur Cazal, la ponction-biopsie du foie a été adoptée par tous les services hospitaliers montpelliérains et c'est à l'heure actuelle un moyen d'exploration de premier plan, probablement le meilleur, de la glande hépatique, non seulement pour poser un diagnostic mais aussi pour orienter le pronostic, suivre l'évolution et les résultats des thérapeutiques. Elle fait partie de ce que Noël Fiessinger et Walter ont appelé « l'instantané hépatique », et il faut bien avouer que dans cet ensemble d'explorations fonctionnelles et histologiques elle occupe la première place, car les tests sérologiques du foie ne peuvent donner que des approximations, des renseignements indirects sur l'état de la glande et encore ne concernent-ils qu'un métabolisme particulier; et comme par ailleurs

ils sont basés sur des modifications physico-chimiques des humeurs, ils peuvent être influencés par des affections non hépatiques et surtout rénales.

La ponction-biopsie du foie seule permet de voir; mais encore faut-il savoir chercher. C'est qu'en effet il est fort étonnant de constater que dans l'innombrable multitude de publications histo-cliniques et de documents iconographiques que nous a valu ce nouveau moyen d'exploration, on ne trouve que de rares travaux relatifs à l'étude histochimique et histophysiologique du foie humain.

Evidemment la ponction-biopsie du foie a un double intérêt: comme méthode de recherche et comme moyen de diagnostic. Nous ne nions pas que ce qui importe pour le clinicien est, d'abord et avant tout, un diagnostic anatomique et que les colorations standards employées par les anatomopathologistes suffisent souvent pour poser ce diagnostic.

Mais il faut avouer que ces colorations sont bien souvent insuffisantes, et sans oser dire comme Langeron que la coloration à l'hématéine-éosine si enracinée dans la technique histologique « ne montre rien », il est incontestable qu'elle ne permet qu'une vue d'ensemble, suffisante le plus souvent quand il s'agit de lésions à l'échelle tissulaire ou organique mais combien inefficace quand il convient de déceler des modifications cytophysiologiques.

Et cependant le foie suivant l'excellente définition de Florkin est « le véritable laboratoire chimique central de l'organisme », à son niveau a lieu un intense métabolisme concernant les glucides, les lipides, les protides et des substances minérales diverses, il n'est pas spécialisé mais possède au contraire des capacités chimiques très variées. C'est dire tout l'intérêt que peut présenter *a priori* l'étude histo-chimique et histo-physiologique du foie; car l'histologie ne peut plus se limiter à des constatations morphologiques, « elle doit s'efforcer de suivre dans les cellules les modifications structurales », et aussi « les modifications chimiques liées au fonctionnement cellulaire lui-même mais qu'aucune modification de structure histologique n'accompagne. Transportant dans le domaine de l'histologie les méthodes de la chimie, l'histochimie représente un degré plus élevé dans l'évolution de l'histophysiologie » (Turchini).

C'est dire que l'histo-physiologie doit révéler des images fonctionnelles d'activité cellulaire à côté d'images anatomiques, l'histologie ne doit pas se contenter d'images statiques mais s'élever sur un plan dynamique.

Aussi les histologistes ne s'y trompèrent pas qui étudièrent largement du point de vue histochimique et histophysiologique le foie de divers animaux. Et il est regrettable de constater que des travaux similaires concernant le foie humain sont rares. Il est toutefois exact qu'on décèle souvent le glycogène, le fer ionisé mais les résultats ainsi obtenus sont insuffisants et ne concernent qu'un des multiples aspects de la physiologie hépatique.

*
**

Aussi, avons-nous été tenté par des recherches histochimiques et histophysiologiques sur le foie humain. Mais devant le vaste horizon qui s'offrait à nous il a bien fallu se limiter et choisir.

— Le développement immense pris par l'histo-enzymologie moderne nous a incité à étudier au niveau du foie humain quelques-uns de ces ferments solubles et tout particulièrement les *phosphatases et les lipases*. On sait en effet que l'intervention des phosphatases se manifeste dans les processus généraux les plus divers et tous les métabolismes. Nous pensions qu'en outre des recherches sur les lipases pourraient orienter certains diagnostics et pronostics des hépato-stéatoses de l'enfant et de l'adulte; malheureusement l'impossibilité de nous procurer certains produits chimiques étrangers nous obligea à abandonner momentanément l'étude des lipases pour nous cantonner exclusivement dans le domaine des phosphatases.

— D'autre part, le rôle que joue le foie dans la synthèse protéique n'est plus à démontrer. Les recherches biochimiques modernes d'une part, les travaux expérimentaux sur l'animal d'autre part, concordent pour faire de la glande hépatique le lieu et l'agent essentiel de la synthèse de certaines protéines sériques, synthèse qui serait en rapport avec les acides nucléiques. Aussi cela nous a-t-il poussé à étudier le comportement des *nucléo-protéines et des acides nucléiques* des foies humains normaux et pathologiques.

— Enfin, nous avons effectué au cours de ce travail *un*

*grand nombre de détections histochimiques diverses* s'appliquant à des constituants les plus variés pour essayer de résoudre certains problèmes intercurrents. Le titre que nous avons donc donné à cet essai, que certains trouveront trop vague et imprécis, nous a paru de ce fait légitime.

Ces recherches ne s'intègrent donc pas uniquement dans un programme de recherche scientifique pure mais aussi dans le domaine histo-clinique; nous les avons orientées sous deux angles: l'angle histophysiologique et l'angle histophysiopathologique.

⁂

Nous présentons l'ensemble de ce travail en trois parties :

— Faisant constamment appel à des connaissances histologiques et histochimiques, il ne nous a pas semblé superflu de faire un bref rappel des notions classiques dans ces domaines. Nous avons donc exposé dans la *Première Partie*, les connaissances actuelles relatives à l'histomorphologie, à l'histochimie et à l'histophysiologie hépatiques.

— Dans la *Deuxième Partie*, nous exposerons nos recherches histochimiques et leurs résultats. Suivant un plan préétabli, nous l'avons subdivisée en deux chapitres:

— Le Chapitre I sera réservé à l'histochimie des phosphatases hépatiques;

— Le Chapitre II à l'histochimie des nucléoprotéines et des acides nucléiques hépatiques.

— Et dans la *Troisième Partie* nous essayerons d'intégrer les aspects morphologiques et histochimiques décrits dans la partie précédente dans le métabolisme normal et pathologique de la glande hépatique. Ce sera la contribution histophysiologique de notre travail.

⁂

Ce serait de l'ingratitude que d'exposer nos résultats sans exprimer notre reconnaissance aux maîtres qui ont orienté nos études, dirigé notre travail ou en ont facilité l'exécution.

Cet essai n'a pu être réalisé que grâce à l'amabilité de M. le Professeur Pagès qui nous a accordé voilà trois ans la géné-

reuse hospitalité de son laboratoire, nous a ouvert ses crédits et mis son matériel, ses collections et sa bibliothèque à notre disposition. Nous ne saurons jamais assez le remercier de sa bienveillance à notre égard et de l'aide qu'il nous a apportée. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre très vive reconnaissance.

L'histochimie est une science difficile et délicate. Pendant un court séjour dans son laboratoire, M. le Professeur Turchini nous a initié à cette branche importante de l'histologie et dirigea un apprentissage si plein d'embûches. Il a su nous inculquer la pondération dans l'interprétation des résultats et l'impératif exigeant d'une technique précise. Aussi le remercions-nous de ses enseignements et de la bienveillante sympathie qu'il nous a toujours manifestée.

Nos sentiments d'affectueuse gratitude vont tout particulièrement à M. le Professeur Carrère, qui nous a fait l'honneur de nous choisir comme Chef de laboratoire et qui, à la faveur de nombreux entretiens, a su nous intéresser à l'étude si féconde de la Microbiologie et de l'Immunologie modernes.

Nous exprimons notre reconnaissance à M. le Professeur Cazal à qui nous devons la meilleure part de notre formation de biologiste. Il fut l'instigateur de ces recherches et il a bien voulu nous honorer de sa confiance en nous proposant le sujet de ce travail. Il nous a toujours suivi, conseillé et guidé dans les jours difficiles avec une bienveillante attention.

Mais une telle étude exigeait des compétences en de multiples disciplines que nous sommes loin de posséder; aussi savons-nous gré à MM. les Professeurs Bénézech et Loubatières de nous avoir conseillé et guidé dans les dédales d'une bibliographie ingrate.

Nous ne saurions terminer sans assurer M. le Professeur Harant, qui ne figure pas à notre grand regret dans notre jury de thèse, de notre profonde gratitude. A son contact nous avons pu ramasser « les éléments épars de la gerbe » car nous avons puisé dans ses enseignements la doctrine et l'esprit qui vivifient; sans l'intelligence pour la fertiliser, l'observation est un travail stérile.

PREMIÈRE PARTIE

# LE TISSU HÉPATIQUE : SA STRUCTURE - SES FONCTIONS

La structure du foie est décrite dans les traités classiques d'histologie et ce paragraphe pourra sembler superflu.

Il nous a cependant semblé utile pour la bonne compréhension de ce travail de faire un bref rappel concernant l'histomorphologie, l'histochimie et l'histophysiologie générale de cet organe en réservant une place toute particulière aux travaux des histologistes et des biochimistes de ces dix dernières années qui, en utilisant des techniques d'investigations nouvelles, ont apporté du point de vue cytologique et cytochimique surtout des renseignements de première importance.

## I. — HISTOMORPHOLOGIE

Le foie est formé par la juxtaposition d'une multitude d'unités anatomiques, les lobules hépatiques, séparés et soutenus par des travées conjonctives anastomosées entr'elles et avec la capsule de Glisson, et limitant les espaces portes.

### Echelle histologique

On peut distinguer deux portions dans ce tissu: une portion parenchymateuse épithéliale glandulaire et une portion mésen-

chymateuse, celle-ci plus ou moins différenciée, toutes deux fortement intriquées.

*Les lobules hépatiques* ne sont pas des masses polyédriques, comme on l'envisage trop souvent, mais des formations allongées dont seules les bases et les sections plus ou moins perpendiculaires à l'axe donnent des images hexagonales. Ces sections sont centrées par la veine centro-lobulaire d'où rayonnent les travées hépatiques de Remak séparées par des capillaires sanguins à paroi fenêtrée: les sinusoïdes, à même disposition radiaire se déversant dans la veine centrale.

Les travées hépatiques sont constituées par les tubes glandulaires à lumière centrale sans paroi propre, dont la partie proximale en « doigt de gant » est borgne et différenciée et dont la partie distale beaucoup plus courte est indifférenciée et ouverte en constituant les canalicules biliaires excréteurs. Entre elles les cellules hépatiques limitent un canalicule très réduit à lumière virtuelle: le canalicule intra-trabéculaire ou capillicule, invisible à l'état normal. La travée hépatique est donc assimilable à un tube sécréteur.

Par ailleurs, au contact des travées hépatiques se trouvent de vastes lacunes sanguines ou sinusoïdes bordées par les cellules mésenchymateuses réticulo-histiocytaires de Kupffer anastomosées entr'elles. Celles-ci sécrètent les fibres grillagées d'Oppel, fibres de réticuline formant le squelette du lobule et disposées longitudinalement le long des travées hépatiques et concentriquement à la veine centrale.

Elias est revenu récemment (1949) sur la notion conventionnelle représentant la corde hépatique comme un long cylindre. Pour lui le foie des mammifères est constitué de plaques cribriformes: « les laminae hepatitis » d'une seule cellule d'épaisseur, ces plaques sont anastomosées et délimitent entr'elles des espaces qui contiennent les sinusoïdes. Si ces espaces ou lacunes hépatiques forment un labyrinthe continu en constituant un vaste sac avec des parois souples, comme c'est le cas du foie de l'homme et du chat, il s'agira d'un foie de type sacculaire; si ces espaces sont étroits et cylindriques, comme c'est le cas du foie du cheval et du lapin, il s'agira d'un foie tubulaire, type qui est peu différent de celui qu'il est classique de décrire

mais qui ne s'applique pas au foie humain. Entre ces deux types généraux s'intercallent toutes les formes intermédiaires possibles.

Les lobules sont soudés entr'eux à la périphérie sauf au niveau de leurs angles où se trouvent les systèmes périphériques des vaisseaux portes: artère hépatique, veine porte, canaux biliaires entourés d'une mince atmosphère de mésenchyme non différencié formant les *espaces porto-biliaires de Kiernan.*

### Echelle cytologique

Il faut donc considérer au niveau du foie des éléments parenchymateux épithéliaux et des éléments mésenchymateux.

*Les éléments parenchymateux* sont de deux sortes :

— Différenciés: ce sont les cellules hépatiques;

— Indifférenciés: il s'agit des cellules constituant les parois des canalicules excréteurs.

*Les éléments mésenchymateux* sont également de deux sortes :

— Différenciés: ce sont les cellules de Kupffer;

— Indifférenciés: ce sont les cellules conjonctives banales des espaces portes.

Seuls les éléments différenciés retiendront notre attention car ils sont les seuls à jouer un rôle métabolique direct.

### a) L'ELEMENT PARENCHYMATEUX DIFFERENCIE : LA CELLULE HEPATIQUE

Cellule noble par excellence du tissu hépatique, on la définit classiquement comme polyédrique, volumineuse, bien que ce volume puisse subir des variations en plus ou en moins en fonction du cycle physiologique. Il est en moyenne de 20 à 100 μ.

Comme toute cellule elle possède un noyau baignant dans un cytoplasme.

NOYAU. — De taille assez fixe il mesure de 8 à 15 μ, il est sphérique ou ellipsoïdal. Nous insistons sur le fait que dans

les foies normaux on peut trouver des noyaux de taille très diverses avec une forte prédominance de noyaux mesurant environ 12 μ. Il est entouré par une fine membrane nucléaire invisible avec les fixateurs habituels, doublée par une croûte interne de chromatine. Au microscope électronique cette membrane est lisse sans structure et non perforée pour Baud (1950), mais pour Angulo et Walson (1950) elle est au contraire rugueuse et mesure 0,1 à 0,2 μ d'épaisseur.

Le suc nucléaire est amorphe et non colorable; il contient un réseau chromatinien plus ou moins concentré, toujours lâche et léger cependant avec quelques blocs de chromatine d'aspects et de tailles variés.

On note aussi la présence constante de nucléoles dont le nombre est assez variable: 1 ou 2 classiquement; parfois la chromatine forme autour d'eux un mince anneau pouvant présenter un ou plusieurs renflements.

La présence de cellules binucléées et trinucléées n'est pas exceptionnelle et cette question préoccupe depuis longtemps les histologistes (Noël, 1923). On les rencontre surtout à l'extrémité proximale des travées; leur pourcentage serait, d'après Sulkin, de 11 % dans les foies normaux, cet état étant sans rapport avec la régénération du tissu hépatique. Pour d'Ancona (1941), pour Beams et King (1942), Sulkin (1943), Swift (1950), Pasteels et Lison (1950), certains noyaux hépatiques seraient polyploïdes, la fréquence de cette polyploïdie est supérieure dans les noyaux voisins de la veine centrale et traduirait pour Beams et King le remplacement continu et lent des cellules hépatiques surtout près de la veine centro-lobulaire et serait probablement en rapport avec les cellules binucléées.

Cette polyploïdie serait toujours indépendante du volume du noyau pour Sulkin, mais par contre pour Pasteels et Lison et Swift elle serait en rapport avec le volume nucléaire.

La place du noyau à l'intérieur du cytoplasme est le plus souvent centrale ou paracentrale, mais il n'est pas rare de voir des noyaux avoisiner les sinusoïdes ou les canalicules biliaires.

Le rapport nucléo-plasmique moyen de la cellule hépatique est de un quart.

CYTOPLASME. — A l'état frais sa *substance fondamentale* apparaît comme un fin réticulum dessinant des alvéoles contenant de nombreuses enclaves.

Après fixation la substance fondamentale, qui apparaît sans structure au microscope optique, est finement particulaire au microscope électronique comme l'ont montré Claude et Fullam (1946) : elle semble constituée d'éléments distincts de 50 à 150 millimicron de diamètre, particules que Claude a qualifiées de submicroscopiques ou *microsomes* et qu'il a pu obtenir à l'état isolé. Cette étude au microscope électronique a permis en outre à Claude de voir qu'en dehors de ces microsomes la substance fondamentale présente une texture fibreuse qui n'est probablement qu'un artéfact provenant de la précipitation par l'alcool lors de la préparation du matériel. Chevremont, en 1950, a retrouvé sur des images cytologiques grossies 3.000 fois de fines granulations cytoplasmiques qu'il identifie logiquement aux microsomes de Claude; mais il n'a pu les retrouver au microscope à contraste de phases. Zollinger (1950) par contre, pense les avoir observées dans les mêmes conditions techniques.

La cellule hépatique n'est pas limitée par une membrane d'enveloppe mais simplement par une *condensation exoplasmique* qui permet seulement la délimitation de la cellule; la cellule hépatique est donc nue.

A l'intérieur de ce cytoplasme on trouve de *nombreuses enclaves et des corps figurés.*

— Ces corps figurés sont représentés par les microsomes, qui donnent au cytoplasme une grande partie de sa basophilie, et par le chondriome bien visible à l'état frais au microscope à contraste de phases, très réfringeant et mobile sous forme d'éléments de taille oscillant entre 0,5 et 3 μ (Claude). Il peut se présenter sous une forme filamenteuse: les chondriocontes dans la zone sus-hépatique et sous forme corpusculaire mitochondriale dans la zone périportale. Ces deux formes étant en relation avec un cycle sécréteur (mitochondrie-chondrioconte, Noël). Ce chondriome n'est pas polarisé mais il est disposé dans toute l'aire cytoplasmique.

La cellule hépatique présente aussi un appareil de Golgi, le plus souvent périnucléaire pouvant présenter des migrations péribiliaires (Granel, 1929).

— Les enclaves sont innombrables et variables avec les états physiologiques. Elles peuvent être graisseuses et se voient, surtout après la digestion suivant les repas riches en lipides, dans les cellules périportales d'où elles disparaissent rapidement.

Le glycogène se présente sous forme de grains ou de flaques, ces images n'étant en réalité que le résultat de la coagulation des substances protéiques auxquelles il est fixé. On a aussi signalé de grosses vacuoles à contenu clair renfermant des cristalloïdes apparaissant pendant la digestion (?).

Signalons les corps de Berg dont nous aurons l'occasion de parler plus longuement ailleurs.

Notons enfin qu'à l'état normal les enclaves ferrugineuses biliaires sont invisibles, ce qui est probablement dû à leur trop grande dilution. Cependant de Robertis (1939) décrit constamment la présence intracytoplasmique de fines granulations jaune-vert de pigments biliaires localisées aux pôles biliaires de la cellule.

Claude qui a isolé la plupart de ces éléments cytoplasmiques à l'état pur a proposé de les réunir sous la même dénomination de « granules » comprenant les gros granules: mitochondries et granules sécrétoires, et les granules submicroscopiques: microsomes et particules lipoprotéiques et glycogéniques de Lazarow.

MULTIPLICATION. — Les études concernant l'origine de la restauration de la cellule hépatique sont nombreuses et les résultats font toujours l'objet de controverses.

Milne (1909), Munzer (1923), Miller et Rutherford (1923), Noël (1923), Szittyay (1933), etc..., attribuent à la multiplication une origine amitotique.

Fishback (1929), Schulze, Hall et Baker (1923), Higgins et Anderson (1931), Clara (1932), d'Ancona (1941), Beams et King (1942), etc..., attribuent la restauration de la cellule hépatique aux processus mitotiques.

D'autres aussi nombreux, aux deux processus (Mac Mahon, 1933, Wilson et Leduc, 1948)...

Les auteurs qui ont étudié les foies humains prélevés par

ponction-biopsie ont parfois noté la présence simultanée de mitoses et d'amitoses.

De toute façon, cette faculté de multiplication est faible et probablement due au lent remplacement des cellules hépatiques du foie normal.

### b) L'ELEMENT MESENCHYMATEUX DIFFERENCIE: LA CELLULE DE KUPFFER

Ces cellules, qui constituent le revêtement des sinusoïdes, ont été bien moins étudiées du point de vue morphologique, et pourtant les rôles multiples et divers qui leur sont dévolus mériteraient de plus amples renseignements cytologiques. Elles représentent, selon l'expression de Wolf et Neel « le prolongement intra-hépatique du système réticulo-histiocytaire ». Ce sont classiquement des éléments étoilés et ramifiés envoyant souvent des prolongements entre les cellules hépatiques, prenant parfois contact avec les canalicules biliaires intra-cellulaires (Pavel). Comme elles sont aplaties elles sont peu visibles sur une coupe de foie normal.

Vues de profil elles sont allongées, irrégulièrement polygonales et triangulaires quand elles sont vues de face d'où leur nom de cellules étoilées.

Parfois localisées sur les éperons de division des capillaires, parfois en retrait au fond des poches offertes par les parois infléchies des tubes glandulaires, elles offrent ainsi des positions que Pfühl a qualifiées de « phagocytaires » et de « digestives » car en cette dernière localisation elles se présentent sous des formes globuleuses avec un cytoplasme ventru bourré d'enclaves faisant hernie dans la lumière des vaisseaux.

De ce fait leurs dimensions sont très variables, de 10 à 100 µ quand elles sont en expansion maximum.

Leur noyau est typiquement ovalaire avec un ou plusieurs nucléoles et un fin réseau chromatinien, mais parfois il peut présenter les formes les plus diverses suivant l'état fonctionnel de la cellule.

Le protoplasme est granuleux et contient souvent des inclusions liées à leurs fonctions métaboliques (pigments, graisse,

glycogène...) ; ce protoplasme peut parfois envoyer des expansions pseudopodiques.

Signalons enfin, que comme toute cellule réticulo-histocytaire fixe, elles sécrètent des fibrilles de réticuline, et c'est d'ailleurs dans le foie que celles-ci ont été décrites pour la première fois en 1891 par Von Oppel.

### Aspects du foie sur coupes histologiques

Ces aspects sont variables avec le mode de traitement. Ces modifications histologiques dépendent du mode de prélèvement et de fixation, comme l'ont mentionnés de nombreux auteurs dont Popper (1948) et Cazal (1949). Si bien qu'un même fragment hépatique pourra se présenter à l'examen microscopique sous trois aspects différents :

— En effet sur un fragment de foie fixé quelques heures après le prélèvement, les cellules apparaîtront rétractées et pleines, car il s'est produit une contraction des cellules parenchymateuses par diffusion partielle du glycogène. C'est ce qui se passe habituellement sur les *pièces d'autopsie.*

— Par contre, les *ponctions biopsies* sont suivies de fixation immédiate et l'aspect des coupes histologiques est différent; mais cet aspect varie avec le fixateur employé. Dans le cas d'un fixateur aqueux, le glycogène hydrosoluble diffusera et les cellules hépatiques apparaîtront gonflées mais vides de leur contenu glycogénique, d'où un aspect plus clair du protoplasme. Dans le cas d'un fixateur alcoolique, dans lequel le glycogène est insoluble, les cellules parenchymateuses apparaîtront gonflées et pleines car leur structure protidoglucidique a été mieux conservé.

Ces faits sont importants en histochimie semi-quantitative quand il s'agit d'apprécier visuellement la « charge » d'une cellule en un de ses composants. En histochimie le choix du fixateur est primordial.

## II. — HISTOCHIMIE

L'histochimie a pour but d'étudier les substances chimiques des tissus dans leur localisation naturelle.

Lindestroem-Lang a proposé de réserver le terme de cytochimie pour désigner la détection intracellulaire de constituants chimiques définis, en l'opposant à celui d'histochimie qui désigne les méthodes biochimiques appliquées aux tissus ou à des fragments de cellules.

Ce sont les résultats obtenus par ces deux sortes de techniques que nous exposerons ici.

Cette chimie des constituants cellulaires a fait des progrès gigantesques depuis une dizaine d'années et la glande hépatique, qui a souvent été utilisée comme matériel d'étude, a contribué à cet essor.

Nous n'examinerons que les notions récentes touchant de plus ou moins près à la question des nucléoprotéines, sans parler de la constitution physico-chimique de ces constituants que nous envisagerons à propos des recherches histochimiques.

NOYAU. — « Le terme de *chromatine*, employé pour désigner la substance fondamentale des chromosomes, ne présente pas de signification chimique spécifique, et s'applique seulement à la substance chromatophile riche en acides nucléiques, qui, du point de vue morphologique et quantitatif paraît représenter la majeure partie des chromosomes. » (Barry). Les dénominations anciennes, de basi et d'oxychromatine, désignant seulement les principaux aspects sous lesquels elle se manifeste du point de vue tinctorial (affinité pour les colorants basiques dans le premier cas, le plus fréquent; affinité pour les colorants acides dans le second), sont périmés; aussi a-t-on pu parler avec Henneguy de la « faillite de la chromatine ». En effet, du point de vue chimique, ce n'est pas une entité mais un complexe renfermant 96 % de désoxyribonucléoprotéines résultant de l'union de protéines basiques simples (histones) avec l'acide désoxyribonucléique, associées à des lipides (phosphatides, cholestérol), et à des sels minéraux (calcium, magnésium).

Optiquement la chromatine a la propriété d'absorber les rayons ultra-violets (Kôhler). Cette capacité d'absorption est liée à la nature chimique des protéines présentes, surtout des nucléo-protéines riches en tyrosine et tryptophane. C'est sur

cette propriété qu'est basée l'analyse micro-spectro-photométrique quantitative du noyau (Caspersson et son école, 1936).

En ce qui concerne les *nucléoles*, il faut d'abord s'entendre sur les dénominations; ce terme ne s'applique pas à toutes les formations intra-nucléaires plus ou moins arrondies, mais doit être réservé à certaines de ces formations qui présentent un caractère bien précis (basophilie et acidophilie n'ayant précisément pas cette valeur), donc à celles d'entr'elles qui ont une composition chimique définie ou au moins un comportement précis lors de la réaction de Feulgen. Grâce à ces critères, il est possible de définir comme nucléole vrai toute formation figurée intra-nucléaire Feulgen négatif. donc dépourvue d'acide désoxyribonucléique, et plus précisément constituée par l'association protéines supérieures-acide ribonucléique-phosphatides et histones.

Ainsi se différencient les nucléoles vrais ou plasmatiques ou plasmosomes des faux nucléoles ou nucléoles nucléiniens ou caryosomes qui ne sont que des formations figurées de la chromatine, que celle-ci soit sous forme d'euchromatine ou d'hétérochromatine (Heitz, 1934; Caspersson, 1936); celle-ci contenant outre de l'acide désoxyribonucléique, constituant principal de la chromatine, une faible quantité d'acide ribonucléique.

Signalons par ailleurs que les associations sont assez fréquentes entre ces formations figurées des noyaux des cellules hépatiques: les nucléoles vrais étant souvent entourés d'une mince couche de chromatine renforcée par place de caryosomes aux formes variées et à laquelle Caspersson a donné le nom de « nucleolus-associated-chromatin ».

Le *suc nucléaire* a été beaucoup moins étudié; on sait qu'il est incolorable à l'état normal mais il renferme en solution aqueuse des protéines globuleuses riches en groupes thiol et des lipines, mais pas de glycogène libre.

Enfin, la *membrane nucléaire*, qui comprend en fait trois parties :

— La membrane nucléaire proprement dite, achromatique, formant une pellicule plus ou moins épaisse de nature protéique indéterminée (Baud, 1949) ;
— La membrane chromatique correspondant à la chro-

matine intra-nucléaire tassée contre la membrane proprement dite, et formée de désoxyribonucléoprotéines ;

— La couche périnucléaire à limites imprécises formée de lipides probablement de la catégorie des lipoïdes (Baud, 1949).

Contrairement à ce que l'on pensait autrefois les noyaux sont pauvres en *enzymes:* on y rencontre cependant les phosphatases acide et alcaline, l'adénosine-triphosphatase, la 5 nucléotidase, l'adénosine-désaminase, la nucléosidéphosphorylase, l'arginase, la cytochrome-oxydase, la catalase, l'estérase... (Claude, 1948; Mirsky, 1951). En fait peu d'enzymes respiratoires ou hydrolytiques, il ne semble donc pas que le noyau intervienne dans les oxydations cellulaires.

CYTOPLASME. — La constitution de *la substance fondamentale* est encore inconnue.

*Les éléments figurés* sont mieux précisés :

— Les mitochondries sont formées de protéines, phosphatides, cholestérol, et de petites quantités d'acide ribonucléique; leur sidérophilie est due à ces phospholipides et à l'acide ribonucléique.

Bensley, qui les a analysés donne comme résultat quantitatif: protéines riches en groupes thiol 65 %, glycérides 29 %, lécithines, cholestérol et céphalines 6 %. Cet auteur a par ailleurs constaté dans les mitochondries un pigment brun qu'il considère comme un produit d'oxydation des phospholipides. Kosterlitz (1944) trouve des chiffres sensiblement différents: 74 % de protéines, 15 % de phospholipides et 8 % d'acide ribonucléique.

Ces élements contiennent en outre d'importants enzymes respiratoires: cytochrome-oxydase, peroxydase, cytochrome b, adénosine triphosphatase, succinodeshydrase, déhydrase... Il semble donc que les oxydations cellulaires, qui fournissent à la cellule l'énergie qui lui est nécessaire, se déroulent de façon prépondérante au niveau du chondriome.

— Les microsomes ont comme caractéristique biochimique

spéciale d'être très riches en acide ribonucléique; ils contiennent en outre des protéines et des lipides comme les mitochondries, mais ils s'en distinguent par leur relative pauvreté en enzymes et leur incapacité de réaliser des oxydations complètes (glucose 6 phosphatase (De Duve 1951), phosphatases). D'une manière générale leur teneur en acide ribonucléique tend à diminuer quand on s'adresse à des particules de taille plus grande avec augmentation parallèle de la richesse en protéines.

— L'appareil de Golgi riche en lipides est moins connu.

Nous ne parlerons pas des enclaves cytoplasmiques qui peuvent être de nature chimique fort diverse.

## III. — HISTOPHYSIOLOGIE

Les fonctions si nombreuses assurées par le tissu hépatique sont la corrélation d'un intense métabolisme. Or, si l'on est assez bien renseigné sur les produits initiaux et terminaux de ce métabolisme, les multiples stades intermédiaires ne sont le plus souvent que du domaine de l'hypothèse. C'est le rôle de l'histophysiologie de préciser topographiquement les divers stades successifs des étapes fonctionnelles physico-chimiques.

### Le couple fonctionnel

Les phénomènes essentiels se passent au niveau d'un complexe histologique constitué par les sinusoïdes et ses cellules de Kupffer d'une part, les tubes glandulaires formés des cellules hépatiques d'autre part, c'est-à-dire au niveau de ce couple: cellule hépatique-cellule de Kupffer que Montpellier a nommé *hépaton*, sans que l'on sache exactement si son action est toujours synergique, et sinon quelle est la part respective de chacun des éléments de ce couple fonctionnel.

Ce complexe fonctionne sur deux circuits différents correspondant aux deux grandes fonctions de la glande :

— un circuit sang-hépaton-sang correspondant aux fonctions internes;

— un circuit sang-hépaton-bilè correspondant aux fonctions externes.

## Les conditions générales de travail de la glande hépatique

La physiologie du foie est subordonnée à la circulation sanguine. Le couple hépatique travaille activement parce que la pression du sang dans la capsule hépatique est de 7 mm. de mercure et la pression biliaire dans les conduits biliaires de 250 mm.

Ce travail intense est démontré par la consommation d'oxygène: 0,024 à 0,050 cc. par minute et par gramme de tissu hépatique.

Par ailleurs, le foie se trouve en relais entre les veines mésentériques et la veine cave, les aliments absorbés après la digestion passent en grande partie par le foie, et plus que pour tout autre organe on peut dire que le travail de la cellule hépatique « résulte du passage de l'énergie chimique des aliments cellulaires à l'état d'une forme inférieure, et surtout du caractère exothermique de la réaction. de l'hydrogénation de ces aliments avec des accepteurs d'hydrogène, l'énergie se retrouvant en fin de compte sous la forme dégradée de l'énergie calorifique » (Florkin).

Ce métabolisme intensif se traduit donc par un déchet énergétique: la chaleur; le foie est le centre essentiel de la production de calorique dans l'organisme.

## Histophysiologie du lobule hépatique

Mais le travail ne semble pas également distribué à toutes les unités cytologiques. Comme l'ont montré des travaux déjà anciens de Géraudel et surtout de Noël (1923), le lobule hépatique est fonctionnellement comparable à une cocarde formée de trois zones concentriques :

— La zone péri-sus-hépatique centrale où les cellules sont à l'état de repos permanent et dont le chondriome est constitué de chondriocontes longs, minces et flexueux de calibre égal; car cette zone recevant un sang riche en $CO^2$ et pauvre en oxygène ne reçoit pas suffisamment d'énergie.

C'est la zone de réserve de Noël. Blalock et Mason ont en effet décrit en 1936 un gradient décroissant de tension en oxygène de la périphérie au centre du lobule ;

— La zone intermédiaire moyenne au fonctionnement alternatif : au repos dans le jeûne, active au début de la digestion, cette zone est moyennement oxygénée. C'est la zone sensible ;

— La zone périportale externe constamment en travail : ses cellules sont toujours chargées d'enclaves, leur aspect varie avec l'alimentation : après un régime protidique, lipidique, ces cellules sont criblées de granules graisseux, leur chondriome est sous forme de mitochondries et de chondriocontes épais. Après un régime glucidique on y décèle de larges plages claires contenant des granulations et du glycogène entre de nombreux chondriocontes.

Tous les travaux ultérieurs (Turchini et Meites, 1943 ; Deane, 1946 ; Lagerstedt, 1949 ; Moyson, 1952...) n'ont fait que confirmer cette disposition ; qu'il s'agisse de métabolisme glucidique, protidique ou lipidique, les histologistes sont d'accord pour considérer la zone périportale comme le siège presque exclusif du métabolisme hépatique.

### Corrélations histophysiologiques des diverses fonctions métaboliques hépatiques

Les fonctions hépatiques sont multiples et nos connaissances relatives aux mécanismes histophysiologiques qui les régissent sont assez imprécises. Les rôles joués par les organites cellulaires et les éléments figurés dans le métabolisme de la cellule hépatique sont loin d'être clairement connus malgré les importantes recherches qui leur ont été consacrées. Les exposer serait par ailleurs sortir du cadre de ce travail.

Nous nous contenterons, dans un chapitre ultérieur, d'approfondir le rôle que jouent les nucléoprotéines, les acides nucléiques et les phosphatases dans le métabolisme de la glande hépatique.

DEUXIÈME PARTIE

# RECHERCHES HISTOCHIMIQUES SUR LE FOIE HUMAIN NORMAL ET PATHOLOGIQUE

Ce travail a été effectué essentiellement sur des foies humains. Nous avons cependant au préalable effectué quelques essais sur des foies animaux, principalement de cobayes, en vue d'essayer et de mettre au point quelques techniques de coloration, mais les résultats n'en seront pas consignés ici.

Parmi ces foies humains, la grande majorité a été prélevée par ponction-biopsie, quelques-uns proviennent de nécropsies; au total, 212 prélèvements dont 202 ponctions-biopsies (P.B.F.) et 10 nécropsies. Ces P. B. F. proviennent pour une part de malades en traitement à l'hôpital pendant le cours de ce travail, pour une autre part des riches collections de M. le Professeur Cazal dans lesquelles nous avons abondamment puisé.

Avant d'entrer dans les détails, concernant les recherches se rapportant aux différents groupes de détection envisagés, nous donnerons un rapide aperçu des conditions générales de prélèvement et de fixation, nous réservant d'y revenir longuement au chapitre correspondant. Nous donnerons simplement ici une vue d'ensemble du **protocole général**.

Il est inutile de revenir sur les techniques désormais classiques appliquées aux P. B. F. sur lesquelles la monographie de Cazal: « La Ponction-Biopsie du Foie » donne tous les renseignements. Signalons cependant les points particuliers concernant les heures de prélèvement, les fixations et les destinées des fragments hépatiques.

## PREPARATION DU MALADE

Si elle est primordiale pour certaines recherches, elle ne semble guère avoir d'intérêt dans la détection histochimique des enzymes et des nucléo-protéines. Il y a en effet des variations rythmiques diurnes et nocturnes des graisses, du glycogène, des acides biliaires, d'où variation de concentration de ces substances au niveau du foie, probablement en rapport avec la digestion, rythme qui a été signalé par de nombreux auteurs tant chimistes qu'histochimistes. Il faut donc dans ce cas exécuter les P. B. F. le matin, le malade étant à jeun depuis le repas de la veille. Mais il y a plus grave: c'est la variation de concentration en glycogène avec le sexe comme cela a été récemment signalé, ce qui montre toute la relativité des évaluations histochimiques des charges glycogéniques.

En ce qui nous concerne, il n'y a pas de telles variations nycthémérales et les études histochimiques antérieures relatives aux enzymes et aux nucléoprotéines ont révélé des images stables et semblables au cours d'une même journée avec un régime alimentaire varié et équilibré.

Aussi Lagerstedt (1949) n'a relevé aucune différence entre les images histologiques des corps basophiles cytoplasmiques hépatiques et le dosage concomitant de l'azote total sur des foies prélevés à 7, 13 et 23 heures.

Kochakian, Bartlett et Moe (1948) nous ont appris par ailleurs que les phosphatases alcalines et acides hépatiques et rénales du rat normal ou surrénalectomisé ne sont pas modifiées par un régime très riche en protides ou en glucides. Et si Wachstein et Zak (1946) ont montré que le jeûne ou un régime carencé en protides augmente nettement la phosphatase des canalicules biliaires du foie sans affecter celle de l'intestin

grêle, nous ferons remarquer que nous sommes déjà dans un domaine anormal.

*Aussi nos prélèvements proviennent-ils de malades ponctionnés à des heures variables de la journée et recevant un régime alimentaire normal.*

## FIXATION

Il est maintenant entré dans la routine hospitalière montpelliéraine de fixer les P. B. F. au Bouin-Hollande-alcoolique sublimé (B. H. A. S.), fixateur qui convient parfaitement pour l'étude de certains constituants alcoolo-insolubles mais qui malheureusement ne pouvait toujours convenir pour notre travail. Il n'y a pas hélas de fixateur universel, et nous fûmes souvent appelé à choisir des fixations diverses suivant la détection envisagée. Nous reviendrons plus loin sur les choix des fixateurs mais d'ores et déjà, nous pouvons indiquer le protocole général de la technique.

Aussitôt le boudin de foie retiré par ponction on le projette sur un petit plateau et on le sectionne en deux parties à peu près égales:

— Une moitié est fixée au B. H. A. S.; nous avons effectué sur ce fragment les colorations standards et aussi quelques recherches concernant les nucléo-protéines;

— La deuxième moitié est mise dans de l'acétone glacé et transportée immédiatement au réfrigérateur à 4° pendant 6 à 12 heures; sur cette portion nous avons recherché les enzymes et parfois les nucléoprotéines.

Comme au cours de cette étude nous avons eu à résoudre d'autres problèmes histochimiques, qui se sont posés en cours de travail, certaines P. B. F. furent parfois fixées au formol au Helly, au Carnoy, etc...

*
**

Toutes ces P. B. F. proviennent des services hispitaliers de Clinique médicale et de Médecine infantile, et nous remercions les Docteurs Mirouze et Jean, qui nous les ont procurées,

d'avoir fait preuve d'une grande compréhension en rompant avec la routine habituelle de la fixation au B. H. A. S.

Ce travail ainsi posé demandait des compétences cytologiques et un gros travail technique, délicat, difficile et souvent fastidieux (plus de 1.000 lames montées dont 800 colorées).

En ce qui concerne la cytologie et la cytopathologie, le Docteur Loubatières nous a prodigué ses conseils et nous a fait profiter de ses connaissances de fin cytologiste, ce dont nous le remercions bien vivement.

Quant au problème technique, nous avons trouvé en M. Roure, aide technique du laboratoire de Pathologie générale, un assistant précieux qui ne nous ménagea ni son temps, ni ses conseils de technicien averti. Nous ne saurons jamais trop le remercier de son aide et de la patience dont il fit preuve à notre égard.

*
**

Les meilleures descriptions ne remplacent pas la vision directe, aussi avons-nous abondamment illustré le texte : les micro-photographies en noir effectuées avec talent par M. Herbaud, aide technique au laboratoire d'Anatomie pathologique, sont indispensables pour montrer l'aspect réel des préparations mais elles ne sont pas suffisantes pour l'histochimie qui révèle des structures colorées. Aussi, dans l'impossibilité matérielle d'effectuer des photographies en couleur, avons-nous inséré dans ce travail quelques planches de dessins en couleur qui ont le grand avantage de bien mettre en lumière les détails de structure, de coloris et les variations infiniment délicates de la mise au point microscopique.

CHAPITRE I

# Histochimie des phosphatases hépatiques

## A) INTERET DE CETTE ETUDE

L'étude de la détection histochimique des phosphatases (Ph) hépatiques présente de nombreux intérêts.

— *L'hydrolyse et la synthèse des multiples combinaisons ortho, méta, et pyrophosphoriques des cellules sont catalysées par des Ph;* comme ces réactions ne sont pas la propriété exclusive de certaines cellules ou de certains tissus on peut en déduire que ces enzymes entrent probablement dans la constitution de tous les éléments vivants. Mais ces combinaisons phosphoriques sont des étapes des métabolismes glucidique, lipidique, protidique et même de sels minéraux. Or, on sait le rôle primordial que joue le foie dans ces divers métabolismes. C'est donc dire toute l'importance que peut présenter *a priori* la détection *in situ* de ces enzymes au niveau de la glande hépatique.

Dans le cadre du métabolisme glucidique, il semble que certaines de ces réactions phosphorylantes et déphosphorylantes mettent en jeu des enzymes répondant à des types généraux à des « systèmes phosphatasiques », tandis que des enzymes

spécifiques sont indispensables à d'autres, toutes deux ayant un rôle primordial dans la glycogénoformation et la glycogénolyse.

Par ailleurs, la richesse du foie en phosphomonoestérase I, si elle n'est pas comparable à celle du rein ou de l'intestin, mérite d'être signalée; et précisément le métabolisme des lipides paraît être sous la dépendance de l'activité de Ph dans la mesure où il comporte la synthèse ou la dégradation de lécithines et de corps voisins.

Enfin les Ph participent au métabolisme des protides et des nucléoprotéines, à leur dégradation en les déphosphorylant ou peut-être en aidant à leur synthèse.

En bref, c'est le problème de *l'histophysiologie des phosphatases* qui est posé.

— Jusqu'à ces dernières années le clinicien n'avait à sa disposition qu'*un seul test d'exploration des systèmes phosphatasiques: les phosphatasémies,* examen biologique dont l'intérêt en tant qu'élément séméiologique du diagnostic de certains états pathologiques n'est plus à démontrer. Ces activités phosphatasiques sériques présentent des variations principalement dans les affections du métabolisme phospho-calcique d'une part et dans les troubles de l'élimination biliaire d'autre part. Il paraît donc séduisant d'étudier cette deuxième méthode d'exploration phosphatasique qui, si elle apparaît plus incertaine au point de vue quantitatif permet une localisation *in situ* de l'activité enzymatique et nous donnera peut-être quelques renseignements sur la pathogénie de ces hyperphosphatasémies.

— Enfin, il était permis de se demander si cette détection histotopochimique ne pourrait aider l'histopathologiste en lui révélant certains aspects anormaux de l'histophysiologie hépatique et *concourrir ainsi à orienter son diagnostic et son pronostic.*

C'est donc en résumé un *triple intérêt,* histomorphologique, histochimique et histophysiologique qui nous a incité à entreprendre cette étude.

## B) APERÇU BIOCHIMIQUE SUR LES PHOSPHATASES

Toute l'histochimie des Ph est évidemment basée sur des considérations physicochimiques, il importe donc de donner un bref aperçu sur la biochimie de ces enzymes pour pouvoir comprendre les mécanismes de détection, en discuter les modalités d'application et apprécier la valeur des résultats.

DÉFINITION. — Biochimiquement parlant les Ph sont les enzymes libérant des ions phosphoriques à partir de divers substrats naturels ou synthétiques, ces ions pouvant être ortho, méta ou pyrophosphoriques.

Ce sont donc des estérases catalysant l'hydrolyse et la synthèse des esters des acides phosphoriques. En réalité les Ph constituent un groupe d'enzymes un peu particulier car toutes les actions phosphatasiques ne sont pas catalysantes d'hydrolyse: la transformation des métaphosphates en orthophosphates n'est, par exemple, qu'une hydratation.

CLASSIFICATION. — Pour pouvoir classer les Ph, il faut avoir présentes à l'esprit deux notions dont l'interférence permet d'établir une classification rationnelle :

— la première notion est celle de la spécificité du substrat ;

— la deuxième, celle de pH optimum, d'où découle la notion d'isodynamie : les diastases isodynames étant celles qui agissent sur les mêmes substrats mais dans des conditions de pH différentes.

I. — On peut tout d'abord distinguer, dans ce monde des Ph, *deux grands groupes suivant leur spécificité :*

— Les Ph spécifiques d'un type de liaison, mais non d'un substrat, ceux-ci pouvant être les plus divers pourvu qu'ils aient la liaison phosphorique correspondante ;

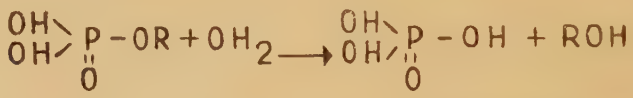
— Les Ph spécifiques d'un substrat ou n'agissant que sur un petit nombre de substrats.

*a*) C'est le premier groupe qu'on décèle par les méthodes devenues classiques de Gomori et Takamatsu, elles n'ont rien de

spécifique car elles sont seulement liées à la liaison phosphorique.

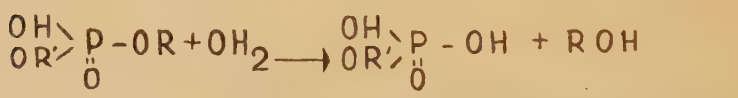
Dans ce groupe on peut identifier quatre séries principales suivant la nature de la liaison hydrolysée :

— Les phosphomonoestérases dont les substrats correspondants sont des monoesters de l'acide orthophosphorique qu'elles scindent en A. O. P. et alcool ou phénol suivant le schéma suivant :



On les a rencontrées dans les os, le rein, l'intestin, *le foie*, les bactéries, les levures, les champignons, etc...;

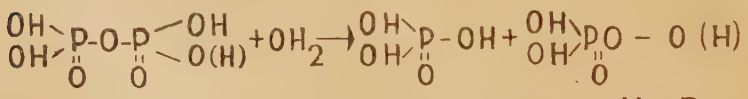
— Les phosphodiestérases qui catalysent l'hydrolyse des diesters de l'A. O. P. en A. O. P. et monoester de l'A. O. P. suivant la réaction générale :



R, R' = Radicaux organiques

On les rencontre dans le rein, les levures, les champignons, les bactéries, *le foie*, le venin de serpent, etc...

— Les pyrophosphatases catalysant l'hydrolyse des pyrophosphates organiques ou inorganiques en A. O. P. et esters orthophosphoriques de l'A. O. P.



H = R

On les rencontre dans *le foie*, le rein, l'intestin, les hématies, les levures, les bactéries, les champignons, etc...

— Les phosphamidases qui catalysent l'hydrolyse des amides orthophosphoriques en A. O. P. et amine selon la formule générale :

On les trouve dans le rein, les levures, le son, les moisissures, mais *pas dans le foie.*

Parmi ces phosphatases spécifiques d'un type de liaison, seules les phosphomonoestérases et les phosphamidases ont été jusqu'à présent décelées histochimiquement.

*b*) A côté, nous avons tout un groupe de Ph spécifiques d'un substrat ou d'un petit nombre de substrats, dont l'étude n'est qu'ébauchée et qui présentent un intérêt théorique considérable puisqu'elles nous permettraient de mieux connaître les étapes intermédiaires des métabolismes glucidique, protidique et lipidique. Jusqu'à présent on a pu déceler l'adényl-pyrophosphatase, la 5 nucléotidase, la choline phosphatase, l'hexose diphosphatase, la phytase et bien d'autres, agissant sur l'acide adényl-pyrophosphorique, l'acide nucléotide 5 phosphorique, les diesters de la choline, l'acide fructose diphosphorique, l'acide inositohexaphosphorique...

Leur étude est cependant peu avancée et leur individualité parfois douteuse.

II. — *La deuxième notion de pH optimum* permet, dans le premier groupe mentionné de distinguer 4 Ph isodynames. Folley et Kay les ont désignés sous le nom de Ph A.1, A.2, A.3, A.4, et Roche et Courtois sous les noms de phosphomonoestérases I, II, III, IV.

— la Ph I a un pH optimum compris entre 8,8 et 9,4;
— la Ph II a un pH optimum compris entre 5 et 5,4;
— la Ph III a un pH optimum compris entre 3,9 et 4,2;
— la Ph IV a un pH optimum compris entre 5,4 et 6,2.

On voit donc que dans cette tétrade une seule Ph peut être qualifiée d'alcaline: la Ph I ou A.1. Les trois autres sont des Ph acides et ont un pH d'action très voisin; les histochimistes ne précisent pas le nom de la phosphatase décelée et se contentent de l'appeler: Ph acide ou alcaline; en fait la Ph alcaline des histochimistes est la phosphomonoestérase I et la Ph acide des histochimistes est la phosphomonoestérase II, car pour les déceler on opère respectivement à des pH voisins de 9 et de 5.

On a décrit aussi des phosphodiestérases, des pyrophosphatases et des phosphamidases isodynames.

Constitution. — D'après Willstäter une portion seulement des enzymes contenus dans une cellule peut en être retirée par dissolution simple dans l'eau ou les mélanges hydro-alcooliques sans mise en jeu d'éléments modifiant la constitution chimique: ce sont *les lyoenzymes.*

L'autre portion est fixée aux éléments insolubles du cytoplasme soit par des valences principales soit par des forces de Van der Walls: ce sont *les desmoenzymes.*

On décrit donc pour les Ph: des lyo et des desmoenzymes.

Le traitement par l'alcool et l'acétone précipite les Ph; les lyophosphatases se redissolvent quand on traite par l'eau, seules donc elles peuvent être purifiées, mais du fait de cette hydrosolubilité elles échappent aux instigations histochimiques qui ne détectent que les desmophosphatases.

D'après les hypothèses générales de Bertrand, von Euler et Willstäter, les enzymes seraient constitués d'un groupement prosthétique: *le coenzyme* et d'une protéine spécifique: *l'apoenzyme.* Le coenzyme comprend souvent dans sa formule une vitamine hydrosoluble mais quelquefois aussi un oligo-élément: un métal par exemple. On sait aujourd'hui que la phosphomonoestérase I de pH optimum 9 et cristallisée par Roche, Nguyen van Thoai et Sartori appartient au groupe des enzymes à métal dissociable, c'est une métalloprotéine magnésienne.

On pense qu'il en est de même pour les phosphomonoestérases acides et les pyrophosphatases alcalines.

Cinétique. — On explique le mode d'action des Ph par la fixation de l'enzyme sur le substrat avec lequel il forme une combinaison dissociable, cette combinaison étant régie par la loi d'action de masse.

On a déterminé des constantes d'affinité pour des substrats donnés. Le mode d'action est en somme conçu comme résultant de la notion d'enzyme à métal dissociable et de celle d'*effecteurs.* On appelle ainsi avec Bersin, des corps qui augmentent ou diminuent la vitesse d'action enzymatique. Les Ph sont toujours accompagnées dans les tissus d'un tel système d'activateurs et d'inhibiteurs particulièrement complexe.

Parmi ces effecteurs on distingue: des activateurs comme

TABLEAU 2. — LOCALISATIONS TOPOGRAPHIQUES CYTOLOGIQUES DES PHOSPHATASES ALCALINE ET ACIDE DES ÉLÉMENTS CELLULAIRES DU FOIE HUMAIN NORMAL ET PATHOLOGIQUE.

(Sont encadrées de noir les différences topographiques importantes).

| L'activité enzymatique est proportionnelle au nombre de croix | Normal | | Hépatites | | Cirrhoses | | Stase biliaire | | Stéatoses | | Épitheliomas | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Ac | Al | Ac | Al | Ac | Al | Ac | Al | Ac | Al | Ac | Al |
| Cellule hépatique | | | | | | | | | | | | |
| — Membrane nucléolaire | ++ | + | ++ | + | ++ | + | ++ | + | ++ | + | ++ | + |
| — Nucléole | + | ++ | 0 | ++ | 0 | ++ | 0 | ++ | 0 | ++ | 0 | +++ |
| — Chromatine | ++ | + | ++ | + | ++ | + | ++ | + | ++ | + | ++ | + |
| — Cytoplasme | +++ | ± | ++++ | ± | +++ | ± | +++ | ± | ++ | ± | +++ | ± |
| — Chromosomes | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Cellule de Kupffer | | | | | | | | | | | | |
| — Noyau | +++ | + | +++ | + | +++ | + | +++ | + | +++ | + | +++ | + |
| — Cytoplasme | + | ± | + | ± | + | ± | + | ± | + | ± | + | ± |
| Sinusoïdes | | | | | | | | | | | | |
| — Zone intermédiaire | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | 0 | ++ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| — Zones C.L. et P.P. | 0 | ++ | 0 | +++ | 0 | +++ | 0 | ++++ | 0 | +++ | 0 | ++ |
| Veines centro-lobulaires | 0 | ++ | 0 | +++ | 0 | +++ | 0 | ++++ | 0 | ++ | 0 | ++ |
| Canalicules biliaires | 0 | + | 0 | +++ | 0 | +++ | 0 | ++++ | 0 | ++ | 0 | ++ |
| Veines portes (endothelium) | 0 | ++ | 0 | +++ | 0 | +++ | 0 | ++++ | 0 | ++ | 0 | ++ |
| Artères hépatiques (endothélium) | 0 | ++ | 0 | +++ | 0 | +++ | 0 | ++++ | 0 | ++ | 0 | ++ |
| Canaux biliaires (épithélium) | | | | | | | | | | | | |
| — noyau | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| — cytoplasme | ± | 0 | ± | 0 | ± | 0 | ± | 0 | ± | 0 | ± | 0 |
| Tissu conjonctif porte | | | | | | | | | | | | |
| — Fibroblastes, histiocytes (noyau et cytoplasme) | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| — Fibrocytes — Noyau | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| — Cytoplasme | ± | 0 | ± | 0 | ± | 0 | ± | 0 | ± | 0 | ± | 0 |
| Lymphocytes, polynucléaires (noyau) | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Cellule de Langhans | | | | | | | | | | | | |
| — Noyaux | | | ++ | + | | | | | | | | |
| — Cytoplasme | | | 0 | 0 | | | | | | | | |
| Mastocytes | | | | | | | | | | | | |
| — Noyau et granulations | | | + | ++ | | | + | ++ | | | | |
| Thrombi biliaires | | | | | | | | | | | | |
| Vacuoles nucléolaires : contenu | 0 | 0 | | | | | | | | | | |

Mg ++ qui active la Ph A.1 alcaline à la concentration optimum de 0,005 à 0,001 M. (Jeener et Kay) et qui est d'autant plus activateur que son taux croît jusqu'à M/1.000. Cette action se maintient à M/200, M/100, puis décroît et devient négative à des taux plus élevés de concentration. Mg ++ est encore l'activateur de la Ph A.4 mais il est sans action sur A.2 et inhibe A.3.

Ca ++ et Mn ++ sont aussi des activateurs de A.1 ainsi que Fe ++ et Zn ++ en présence d'acides aminés.

Parmi les inhibiteurs, signalons les thiols qui inhibent A.1, les fluorures et les oxalates qui inhibent A.2 et A.3, le phloridzoside et divers hétérosides à aglycones complexes inhibant l'action de A.1, etc...

Ces notions d'activateurs et d'inhibiteurs sont importantes dans l'application des méthodes de détection.

Nous avons ainsi mentionné les notions nécessaires à la compréhension des réactions, il ne nous paraît pas utile de nous étendre davantage sur un sujet qui sort du cadre de l'histochimie proprement dite.

Nous résumons dans le tableau n° 1 toutes les notions utiles à l'histochimiste.

## C) TECHNIQUES HISTOCHIMIQUES DE DETECTION DES PHOSPHATASES

### I. — HISTORIQUE

— Jusqu'en 1940, la détection histochimique des enzymes se limitait à quelques diastases oxydantes ou réductrices: péroxydase, oxydase, dopaoxydase, thyrosinase.

Depuis lors ont paru, surtout dans les pays de langue anglaise, des travaux importants sur la mise en évidence d'une foule d'enzymes appartenant aux groupes les plus divers, si bien qu'on ne compte pas moins d'un millier de publications concernant la recherche histochimique d'une vingtaine d'enzymes différents. Cette floraison de techniques nouvelles appli-

quées à l'histo-enzymologie ne fut rendue possible que grâce aux perfectionnements incessants des méthodes biochimiques. A la vérité elles ne sont que la transposition sur le plan histologique des méthodes utilisées par les enzymologistes.

— C'est en 1939 qu'indépendamment, Gomori à Chicago, et Takamatsu au Japon, décrivent la première technique de détection des Ph alcalines.

A vrai dire la première démonstration histologique remonte à 1923, date à laquelle Robison et ses collaborateurs (Soames, Mac Leod, Rosenheim, Fell...), en montrant la localisation de cet enzyme dans la métaphyse et la zone juxta-épiphysaire du cartilage de conjugaison des os longs des jeunes mammifères, réalisèrent ainsi la première démonstration histotopographique de la Ph alcaline.

Mais c'est Gomori et Takamatsu qui donnèrent la première méthode d'application générale.

En 1941, Gomori décrit également une deuxième méthode applicable aux Ph acides, et en 1948 une nouvelle technique s'appliquant aux phosphamidases.

Depuis lors un véritable raz-de-marée de publications, concernant la localisation histochimique des Ph, déferla sur la littérature biologique: les deux méthodes essentielles furent critiquées, modifiées, remaniées par tous les expérimentateurs, puis de nouvelles techniques furent décrites, si bien qu'actuellement on ne compte pas moins de 10 méthodes de détection des Ph alcalines et de 5 pour les Ph acides.

— Il serait fastidieux de passer en revue la liste des auteurs ayant travaillé sur cette question, nous ne mentionnerons que les publications intéressant surtout les Ph hépatiques.

En 1941, Gomori publie un premier travail d'ensemble sur la répartition des activités phosphatasiques, alcaline et acide, au niveau des divers tissus normaux et pathologiques.

Kabat et Furth, la même année, donnent aussi leurs résultats sur la distribution de la Ph alcaline.

En 1943, Bourne réalise une élégante modification de la technique de Gomori et expose ses propres résultats.

Wachstein, en 1945, étudie les variations dans la distribution des Ph hépatiques sous l'influence de toxiques divers.

En 1946, Danielli fait une étude critique des techniques de détection de la Ph alcaline. La même année, Emmel fait apparaître un mémoire sur la distribution de ces enzymes suivant les différentes fixations histologiques, que Krugelis complète tandis que Wachstein analyse les procédés de démonstration des activités enzymatiques dans les coupes de tissu.

En 1947, Cappelin propose une nouvelle modification des techniques princeps de Gomori, que Barger simplifie en mélangeant certains réactifs utilisés. Lorch publie une étude critique des différentes méthodes de mise en évidence des Ph nucléaires.

En 1948, Lison présente une revue générale et critique des différentes méthodes proposées, et Danielli a fait de même tout récemment (1953).

Dans une série de travaux échelonnés de 1942 à 1950, Newman, Feigin, Wolf, Kabat, Elvin discutent les techniques et étudient les diverses localisations.

A Lyon, Baud et Fulleringer, en 1948, étudient les ferments de la membrane nucléaire de la cellule hépatique.

Devant les critiques adressées à ses méthodes de détection, Gomori en 1941 publie une nouvelle technique sur la Ph alcaline et une autre en 1949 sur la Ph acide, que Neuman, Ruyter et Neuman critiquèrent encore.

— Ce chapitre, si nouvellement ouvert est en pleine évolution et riche de promesses.

## II. — TECHNIQUES

Nous laissons de côté la phosphamidase qui est absente du parenchyme hépatique et nous ne retenons que les techniques en rapport avec les Ph alcaline et acide, alias phosphomonoestérases I et II; il s'agit donc de Ph spécifiques d'un type de liaison.

Disons tout de suite que les méthodes initiales des auteurs

américains et japonais furent modifiées, complétées, remaniées si bien qu'à l'heure actuelle on peut dire que chaque histochimiste pratique sa propre réaction; il va de soi que les principes restent les mêmes, seuls les détails, les colorations obtenues et les résultats diffèrent, ce qui est d'ailleurs fort regrettable, car il ne peut y avoir de discussion comparative que sur des résultats obtenus par des techniques identiques.

Nous avons donc été obligé d'étudier à notre tour ces réactions, leurs principes, leurs détails techniques et leur valeur, dans le but d'établir une technique reposant sur des bases solides.

## 1. Principes fondamentaux

Réactions. — On caractérise histochimiquement les enzymes en leur soumettant certains corps chimiques dits substrats, qui après analyse se déposent à l'endroit de la réaction sous forme de substance colorée ou non qu'il faudra visualiser.

Si donc on met une coupe d'un tissu riche en Ph, à différents pH en présence d'un glycérophosphate soluble, celui-ci sera hydrolysé en deux radicaux: phosphatique et glycérique, tous deux solubles dans le milieu. Il faudra alors les transformer en sels insolubles, *et visualiser soit le phosphate, soit le radical phénolique* si on a employé un phényl-phosphate comme substrat.

Toutes ces méthodes de détection enzymatique rentrent dans le groupe des techniques de coloration progressive.

— *Pour la Ph alcaline.* Le phosphate sera précipité *in situ* en phosphate de calcium incolore, lequel pourra être détecté:

— Par la technique de Kossa en présence de nitrate d'argent (méthodes de Takamatsu et Gomori, 1939; Hepler, 1940; Kabat et Furth, 1941; Ruyter et Neuman, 1949; Kritzler et Beaubien, 1949...) ;

— Ou bien transformé en phosphate de cobalt incolore puis en sulfure de cobalt noir (méthodes de Go-

mori, 1941-1943; Bourne, 1943-1946; Ruyter et Neuman, 1949) ;

— Ou transformé en laque calcique d'alizarine (Bourne, 1943) ;

— Ou en sel complexe en présence d'acide rubéanique ou dithioxamide (Wachstein et Zak, 1946; Wachstein, 1952).

Le radical alcoolique peut être détecté en le copulant avec l'α-naphtylamine sous forme d'un sel de diazonium coloré (Menten, Junge et Green, 1944).

On peut aussi employer un β-naphtylphosphate (Menten, Junge et Green, 1944, Manheimer et Seligman, 1948), et visualiser le radical naphtolique libéré avec l'α-naphtylamine.

Ruyter et Neuman proposèrent en 1949 comme substrat du glycérophosphate de calcium dont l'hydrolyse donne ainsi directement du phosphate de calcium.

— *Pour la Ph acide*, on ne peut faire appel au phosphate de calcium qui est soluble à bas pH, on précipite donc *in situ* le phosphate de soude en phosphate de plomb qu'on visualise sous forme de sulfure de plomb noir (Gomori, 1941-1950).

Il y a de multiples variantes, mais, quoiqu'il en soit, les techniques doivent toujours obéir à des principes stricts sans lesquels on ne peut faire de véritable histochimie.

Fixations. — Temps primordial puisqu'il s'agit d'insolubiliser l'enzyme; il faut donc choisir un fixateur conservant l'enzyme *in situ*, les enzymes étant solubles dans les fixateurs aqueux ceux-ci doivent être écartés d'emblée, on choisira un liquide alcoolique, acétonique ou chloroformique.

Par ailleurs, la fixation doit se faire à basse température pour inactiver l'enzyme, celui-ci étant actif, chez l'homme du moins, à une température optimum voisine de 37° C.

Inclusion. — Pour la deshydratation de la pièce fixée, éviter l'éthanol, car Novikoff a fait remarquer que l'enzyme finit à la longue par s'y solubiliser. On emploiera donc comme

déshydratant l'acétone, l'alcool amylique ou butylique, ou le chloroforme. Pendant l'inclusion ne pas dépasser 55° C., une température élevée détruisant l'enzyme; une température de 80° C. détruit irrémédiablement toute diastase.

Cette inclusion ne devra pas dépasser deux heures au grand maximum.

Montage sur lame. — De même, lors du collage des coupes, utiliser une platine chauffante tiède. Enfin, au cours du déparaffinage ne pas employer d'éthanol mais de l'alcool butylique ou amylique.

Incubation en présence de substrat. — La lame déparaffinée et hydratée sera donc mise en présence d'un substrat à une température voisine de celle du corps humain pendant un temps déterminé. Si les conditions de pression osmotique de la solution sont peu importantes, les conditions de pH sont très strictes et varient en fonction de l'enzyme à déceler: la solution incubatrice devra donc être tamponnée.

## 2. Etude critique technique

### Fixateurs

*a*) Le procédé idéal de fixation semble bien être celui du freezing-drying d'Altmann-Gersh: l'isopentane et le butane en présence d'acide sulfurique concentré et desséché dans le vide créent un abaissement de température de l'ordre de —40 à —78° C. Les tissus sont conservés et fixés durant une à deux semaines puis deshydratés durant quatre heures dans l'alcool absolu.

Ce procédé a été employé par Goetsch et Reynolds (1951) pour la Ph acide et leur aurait donné des résultats constants.

Malheureusement ce procédé est long et surtout n'est pas à la portée de nos modestes laboratoires.

*b*) Tous les acides détruisent les enzymes ainsi que le sublimé, l'acide picrique, le bichromate de potasse, on ne peut donc utiliser les fixateurs histologiques habituels tels que le Bouin-

Hollande alcoolique sublimé. Par ailleurs, le formol dissout les enzymes et devra de ce fait être rejeté. Seul Eranko a proposé récemment pour la recherche de la Ph acide une fixation à la formaline à 4 % neutralisée par le carbonate de calcium suivie de coupe à congélation.

*c*) Gomori et Takamatsu proposaient l'alcool éthylique à 90-95° avec une durée de fixation de 12 à 24 heures.

Danielli fixe durant 2 heures dans l'alcool à 80°. Kabat et Furth, Emmel, Bourne, Deane, Dempsey, Gomori, fixent à l'acétone à 4° C pendant 18 à 24 heures.

Selon Emmel, Danielli, Krugelis, tous ces fixateurs ne produisent qu'une faible perte de l'activité enzymatique si le temps de fixation ne dépasse pas 24 heures.

Danielli a essayé une vingtaine de fixateurs et Lison retient parmi eux les deux mélanges suivants :

Alcool à 70°
Formol à 10 %
Pyridine à 20 %;
ou bien :
Alcool à 80°
Pyridine à 25 %...

avec une durée de fixation de 2 heures.

Cappelin évalue à 20 % la diminution de l'activité phosphatasique du cortex rénal fixé à l'alcool, deshydraté et maintenu durant 24 heures à 56° C., il préfère une fixation au chloroforme qui ne diminue l'activité enzymatique que de 2 %; après cette fixation l'auteur préconise la coupe à congélation.

En résumé, il y a *intérêt à avoir de bons fixateurs histologiques au prix d'une moins bonne conservation enzymatique,* et l'alcool à 80° ou l'acétone à 4° C. combinent la fixation histologique et la conservation enzymatique.

Comme par ailleurs il nous fallait un seul fixateur utilisable pour les deux enzymes, nous avons choisi l'acétone bien que la fixation histologique obtenue par ce procédé, si elle est convenable pour les noyaux, l'est moins pour le protoplasme.

INCLUSIONS ET COUPES .

Toutes les inclusions possibles ont été étudiées :

*a*) La celloïdine fut proposée dans les publications princeps de Gomori et Takamatsu. Elle a l'avantage de permettre l'immersion directe des coupes obtenues dans la solution incubatrice sans préparation préalable. Nous l'avons cependant laissée de côté à cause de la difficulté de cette inclusion.

*b*) La paraffine. Après fixation et déshydratation on éclaircit les pièces dans le xylol puis on les inclut dans la paraffine à 56° C., température maximum, le moins longtemps possible. Après inclusion on débite les blocs suivant la technique habituelle, et on colle et étale les coupes à température aussi basse que possible; on sèche les lames à l'étuve à 37° C.

De nombreux auteurs: Gomori, Wachstein, Kabat, Ruyter et Neuman proposèrent de tremper la pièce deshydratée dans une solution diluée de celloïdine à 2 % avant l'inclusion à la paraffine, opération qui empêcherait toute diffusion ultérieure de l'enzyme.

C'est la méthode d'inclusion que nous avons utilisée.

Nous insistons sur le fait que toutes les coupes doivent avoir la même épaisseur.

*c*) Scurol, carbowax, aquax. Récemment proposés comme milieux d'inclusion par Canivenc et Mayer (1947), ces substances solides à température ordinaire sont des polymères d'oxyde d'éthylène mais possèdent la particularité intéressante d'être solubles dans l'eau. Grâce à ces substances la déshydratation de la pièce est évitée et le temps des opérations réduit. On inclut, on coupe comme pour la paraffine. L'étalement se fait avec de l'eau gélatinée, on sèche au papier Joseph, on trempe dans l'alcool à 95° puis on collodione la coupe pour éviter la dessication.

Cette méthode, *a priori* séduisante, a donné entre nos mains de bons résultats, mais nous ne l'avons pas employée d'une façon systématique.

*d*) Congélation. Les coupes à congélation donnent des images où l'activité phosphatasique est plus forte car les coupes sont plus épaisses, ce qui est surtout gênant pour l'appréciation semi-quantitative des colorations. Nous n'avons pas retenu ce procédé.

Les réactions.

Les lames sont plongées dans la solution de substrat contenant des activateurs spécifiques, solution toujours tamponnée à un pH déterminé et portée à une température optimum de 37-38° pendant un temps toujours identique pour un enzyme donné.

Il est primordial de tamponner les solutions, car les enzymes agissent à des pH à peu près fixes et les produits d'hydrolyse modifient les concentrations ioniques du milieu.

Le temps d'incubation doit être toujours le même, sinon les activités enzymatiques révèlent des images très dissemblables, les deux photographies ci-jointes illustrent parfaitement ces variations. (Photos 1 et 2.)

Parallèlement on fait incuber dans les mêmes conditions une coupe témoin dans une solution dont on exclut le substrat, ou à laquelle on ajoute un inhibiteur enzymatique.

On termine les autres temps de la réaction et on complète par une coloration nucléaire et cytoplasmique pour préciser les topographies.

### 3. Valeur histochimique des méthodes

Toutes les méthodes proposées ont des avantages et des inconvénients, elles ont été souvent critiquées jusque dans les plus petits détails techniques. C'est en utilisant ces critiques que nous avons mis au point les techniques que nous avons par la suite adoptées.

Les critères d'une bonne histochimie enzymologique sont de trois ordres: ils concernent la localisation, la spécificité et la conservation de l'activité diastasique ainsi que Lison l'a récemment fait remarquer (1948).

a) *Phosphatase alcaline.*

— Spécificité. — Basée sur des réactions en cascade par ailleurs indirectes, on peut se demander si la détection finale est bien spécifique. La visualisation de l'enzyme se traduit non par la mise en évidence d'une partie du substrat (ion phosphorique ou radical phénolique) mais par la coloration noire du sulfure de cobalt qui n'a rien à voir *a priori* avec l'action enzymatique.

Les étapes de la réaction peuvent ainsi se résumer dans la méthode 1941 de Gomori :

— On emploie en effet des ions lourds dans cette réaction et ceux-ci ne donneraient-ils pas avec les constituants cellulaires par union physique, absorption ou combinaison chimique avec les protéines, des images que l'on interpréterait comme la Ph recherchée? Si en effet on traite une coupe par du nitrate de cobalt, après lavage un traitement au sulfure d'ammonium donne un brunissement des noyaux mais ce brunissement s'il n'a pas la coloration noire de l'activité phosphatasique traduit cependant l'adsorption du cobalt par le noyau (Ruyter et Neuman; Feigin, Wolf, Elvin et Kabat).

— De plus, le calcium insoluble préexistant dans un tissu se colore comme la diastase et constitue une cause d'erreur. On peut facilement y remédier en traitant préalablement les coupes déparaffinées par un tampon à pH 5, lavage à grande eau et coloration subséquente, ou bien avec Ruyter et Neuman en faisant des colorations identiques sur des coupes témoins dans une solution contenant du nitrate de calcium mais pas de substrat; de cette manière les composés insolubles de calcium qui n'ont pas été formés par action de l'enzyme sont démasqués par comparaison.

— Par ailleurs le sulfure d'ammonium, dans la troisième étape de la coloration, produit avec le fer ionisé un précipité noir de sulfure de fer absolument identique au sulfure de

cobalt coloralement, et qu'on ne peut différencier qu'en le transformant en bleu de Turnbull ou ferricyanure ferreux par une solution chlorhydrique ou acétique de ferricyanure de potassium, ce qui complique singulièrement la technique.

— Pour éviter ces trois inconvénients majeurs il est donc nécessaire de faire deux sortes de témoin :

— l'un où l'on empêchera l'enzyme d'agir :

— soit en l'inhibant par adjonction au milieu d'incubation de cyanure de potassium M/100;

ou en plongeant la lame dans de l'eau à 90° C. 2 minutes;

ou en la chauffant 10 minutes à l'état sec sur un Bunsen (Danielli);

ou en la trempant 10 minutes dans l'acide trichloracétique à 5 %;

— soit en supprimant le substrat de la solution;

— l'autre que l'on traitera comme par la méthode de Gomori, puis sur lequel on fera agir du ferrocyanure de potassium en solution acide.

— En conclusion, *la spécificité de la méthode est suffisante* (Bourne; Menten, Junge et Green; Lison; Gomori) ainsi que le prouvent la concordance des résultats et la concordance entre les techniques mettant en évidence le radical phosphate et celles qui extériorisent les radicaux naphtolique ou phénolique.

Mais dans les cas où l'action enzymatique est faible, elle pourra prêter à confusion.

— Conservation de l'activité enzymatique. — Deux questions peuvent se poser à ce propos :

— L'activité enzymatique se perd-elle au cours des manipulations?

— Combien de temps se conserve l'activité enzymatique dans le fixateur, dans le bloc ou dans la coupe montée non colorée?

— On ne peut répondre à la première question qu'en passant en revue les divers temps de la technique. La fixation est le

temps le plus important puisque de lui dépend la conservation *in toto* de l'activité enzymatique. Nous avons étudié ce point de vue dans les paragraphes précédents, nous rappelerons donc que, à défaut du procédé de freezing-drying, la fixation par l'acétone à 4° C. est la fixation de choix permettant par ailleurs l'étude histochimique de tous les enzymes. Des différents modes d'inclusion nous retiendrons que l'inclusion à la paraffine est excellente si les conditions de température maximum et de délai d'incubation sont observés. Ces remarques s'appliquent aussi au collage des coupes: ne pas trop chauffer sur la platine chauffante et laisser sécher à la température du laboratoire.

Pour la déshydratation des lames, éviter l'éthanol qui dissout l'enzyme, lequel en diffusant donnera des images floues, mais utiliser l'alcool butylique ou amylique.

— La seconde question par contre n'est pas résolue.

Dans le fixateur alcoolique ou acétonique, l'enzyme ne se conserve pas indéfiniment. D'après Danielli cependant, il se conserverait un an au réfrigérateur; ce point est inexact, tout au plus un mois au maximum.

Dans le bloc, Lison rapporte qu'après deux mois l'activité enzymatique a disparu. Nous avons eu l'occasion de vérifier ce dire: après trois mois nous avons obtenu de belles colorations superposables à celles obtenues antérieurement, mais malheureusement pas pour toutes les lames.

Pour les coupes non déparaffinées il en est de même. Lison prétend que l'activité enzymatique disparaît en moins de dix jours. Personnellement nous l'avons trouvée conservée dans certaines lames après trois mois tandis que d'autres avaient perdu toute activité.

Malgré ce, Danielli prétend que la baisse de l'activité est toujours proportionnelle, donc que l'image histologique est la même mais plus atténuée.

En conclusion, devant l'irrégularité des résultats obtenus, il est bon de *recommander un délai maximum d'une semaine entre le début de la fixation et l'accomplissement de la réaction.*

**PHOTO 1. — Foie normal. Phosphatase alcaline** (incubation 1 heure)

L'activité enzymatique ne se révèle que dans la veine porte et les sinuso des adjacents à l'espace porte (en bas et à gauche), ainsi que dans les sinuso des avoisinants la veine centro-lobulaire (en haut et à droite), et au niveau de tous les noyaux cellulaires.

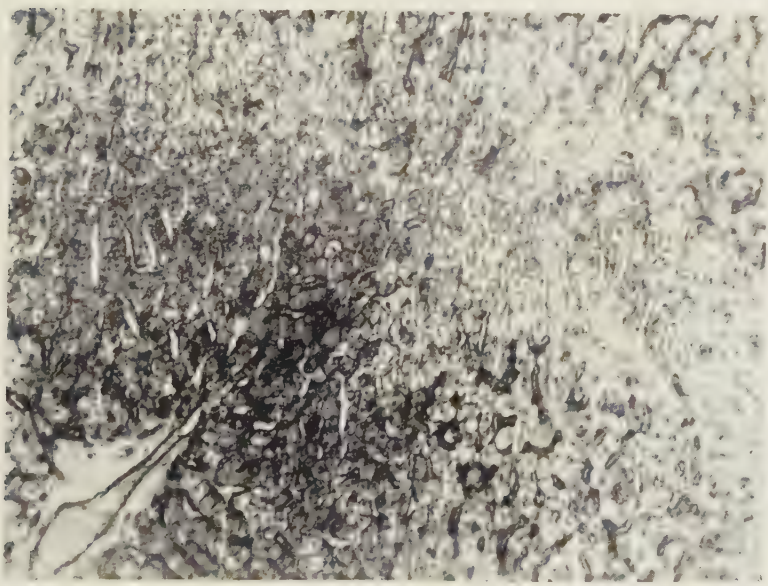


**PHOTO 2. — Même préparation. Phosphatase alcaline** (incubation 20 h.)

Il y a eu diffusion enzymatique à partir des sinusoïdes surtout au voisinage de l'espace porte, et obscurcissement de tous les détails cellulaires avoisinants : les cellules hépatiques paraissent ainsi contenir de grandes quantités de phosphatase alcaline.

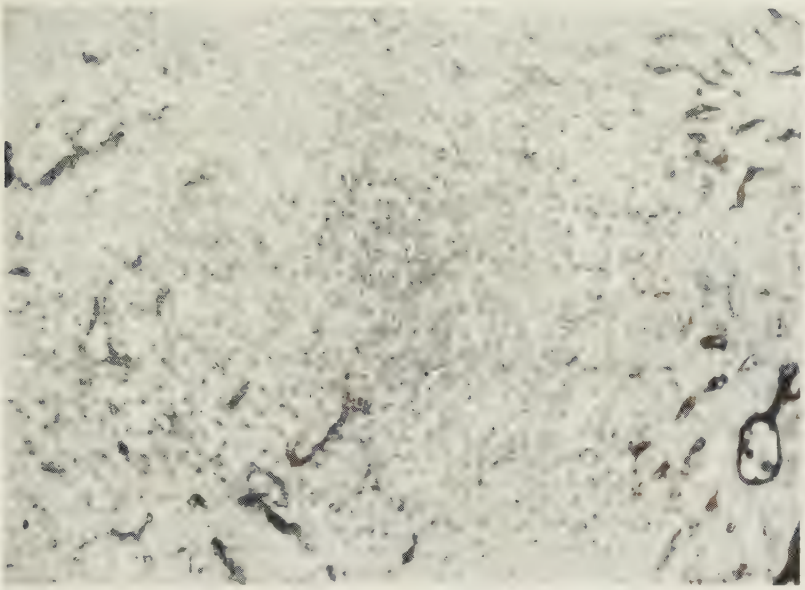


**PHOTO 3. — Foie normal. Phosphatase alcaline** (incubation 2 heures)

Activité enzymatique normale. En haut à droite et à gauche, deux espaces portes. En bas et à droite une veine centrolobulaire. Seuls les sinusoïdes avoisinants les veines centrolobulaires et les espaces portes révèlent une activité enzymatique ainsi que les lumières des veines portes et centrolobulaires et tous les noyaux cellulaires.

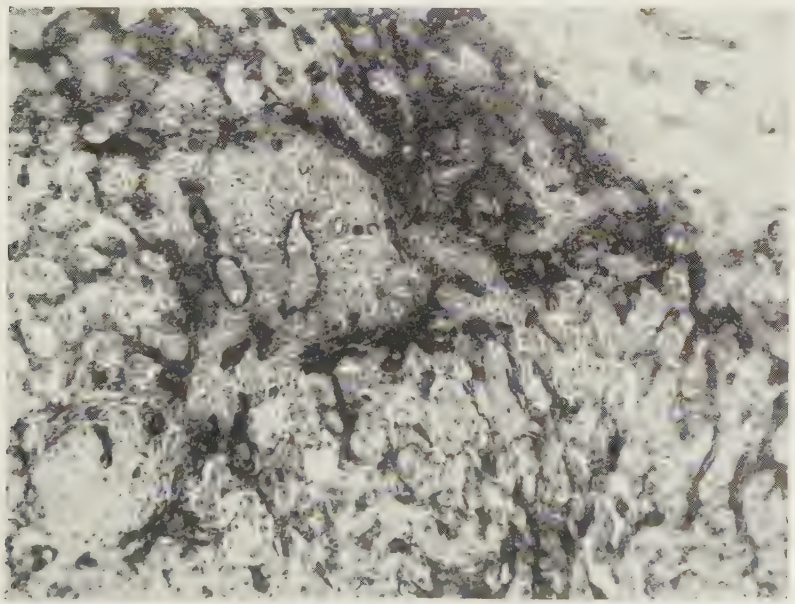


**PHOTO 4. — Hépatite épidémique. Phosphatase alcaline** (incubation 2 h.)

Activité enzymatique sinusoïdale intense obscurcissant les détails des cellules contiguës. Activité cytoplasmique hépatique légère. A droite en haut, îlôt porte avec fibrose abondante sur lequel se découpent les lumières vasculaires délimitées par l'enzyme. Remarquer en bas à gauche l'îlôt cellulaire en nécrose à faible activité.

— Localisation. — Point primordial en histochimie, la localisation doit être exacte, *in situ*.

Ici aussi deux temps principaux interviennent dans la topochimie :

— La fixation *in situ* est-elle réalisable sans diffusion de l'enzyme ?.

— Le premier temps de la réaction, c'est-à-dire la précipitation du phosphate de calcium, se fait-il au point précis de l'activité enzymatique ?

— La première question serait résolue s'il était possible de comparer avec le vivant. Nous avons vu que les phosphatases sont sous deux formes :

— lyophosphatase soluble dans l'eau et l'éthanol;

— desmophosphatase fixée aux protéines cytoplasmiques.

La lyo est donc perdue car elle diffuse vite dans le fixateur: un quart d'heure à une heure; et même si la fixation est courte, le lavage, le séjour de la lame dans la solution incubatrice font disparaître ce qui peut en rester: seule donc est conservée la desmophosphatase.

C'est peut-être à cette dualité chimique que sont dus les avis contraires des chimistes et des histochimistes: Mac Farlane, Gray, Robison prétendent que le foie a une activité enzymatique inférieure de moitié à celle du pancréas, les histochimistes eux considèrent le foie comme le plus riche.

Danielli et Fell ont étudié cette fixation à des pH variés et concluent qu'on ne décèle que l'élément insoluble, d'où la qualité de la fixation de l'enzyme dépend de l'élément cellulaire auquel il est lié.

Tout récemment Friedenwald et Crowell ont pratiqué ces réactions sur les tissus frais et non fixés et ont observé une concordance parfaite avec les résultats obtenus sur des tissus fixés. Il semble donc que les détections effectuées sur les tissus morts correspondent à des images vivantes.

— Danielli a aussi étudié le point de savoir si le phosphate de calcium précipite exactement à l'endroit de l'activité enzymatique et il a montré :

— qu'il y a des constituants cellulaires qui ont une affinité pour le phosphate de calcium, mais qu'il est cependant possible que les lieux de haute activité phosphatasique soient en même temps des lieux d'affinité pour les ions phosphates ;

— qu'il ne peut y avoir de diffusion du phosphate de calcium, de l'endroit où il est libéré par l'enzyme à un autre possédant une affinité pour le phosphate; en superposant deux coupes: l'une d'un tissu riche en phosphate, l'autre d'un tissu ayant une forte affinité pour le phosphate de calcium mais privé de Ph, la réaction de Gomori n'est positive que pour la première coupe et négative pour la deuxième. Le phosphate de calcium ne peut donc diffuser.

— Enfin que si au lieu de mettre en évidence le radical phosphate on visualise le radical phénolique du phénolphtaléine phosphate (méthode de Menten, Junge et Green), on obtient une coloration rouge par libération de phénolphtaléine exactement aux mêmes localisations que s'il s'agissait du radical phosphate; les tissus n'ont donc pas d'affinité spéciale pour ce radical phénolique.

En conclusion, *la localisation de la Ph alcaline obtenue sur des tissus fixés semble bien correspondre aux activités enzymatiques des tissus vivants.*

b) *Phosphatase acide.*

Les techniques de détection des Ph acides ont été moins étudiées et le nombre relativement peu abondant des publications à ce sujet contraste avec la littérature importante concernant la Ph alcaline.

Ceci est très compréhensible car la technique est ici plus difficile et les résultats inconstants, capricieux et souvent décevants.

Signalées par Moog (1943-44), Lassek et Hard (1946), Emmel (1946), Rabinovitch et Junqueira, Tissière (1948), Fajer (1949), Mac Donald (1950), Eranko (1951), etc..., les causes de cette inconstance ne sont pas entièrement élucidées.

Devant ces critiques, Gomori en 1949 publia une nouvelle technique dont les résultats ne sont malheureusement pas parfaits.

Le principe de la méthode est ici un peu différent, puisqu'on transforme le phosphate de soude en phosphate de plomb, mais les critères histochimiques auxquels la méthode doit obéir sont toujours les mêmes.

— Spécificité. — La coupe est mise en contact avec du nitrate de plomb contenu dans la solution du substrat, et il faut s'attendre à une adsorption de ce métal lourd par les nucléoprotéines en dehors de toute activité enzymatique.

C'est ce que mentionnent Newman, Elvin, Kabat, Wolf; qui plus est, cette adsorption augmente du pH 5 au pH 7 mais elle n'a lieu que pour certains noyaux seulement.

Cette adsorption du plomb par les constituants nucléaires suggère la possibilité d'utiliser une méthode d'imprégnation plombique des tissus normaux comme méthode de coloration (Lassek, 1947).

Mais ce handicap peut être surmonté si l'on prend la précaution de faire agir l'enzyme à un pH de 4,7 à 5 et de faire des lames de contrôle en bloquant l'activité enzymatique avec du fluorure de sodium M/100 ou en les incubant dans une solution privée de substrat.

— Conservation de l'activité enzymatique. — Ce critère pose un problème beaucoup plus grave car sans cause apparente les résultats sont très inconstants.

Les conditions techniques thermiques concernant la Ph alcaline s'appliquent de même ici, mais en fait la fixation enzymatique est toujours irrégulière. Il y a une inactivation considérable de l'enzyme pendant la fixation et l'inclusion (Stafford et Atkinson, 1948; Doyle, 1948; Cappelin, 1947; Rabinovitch, Junqueira et Fajer, 1949). Cette inactivation peut affecter les tissus d'une manière plus ou moins uniforme (Wolf, Kabat, Newman, 1943; Emmel, 1946): deux coupes côte à côte sur la même lame ne présentent pas une coloration identique; et Lison, en 1948, fait remarquer que les parties superficielles du bloc ne contiennent plus d'enzyme.

Ce sont des difficultés que nous avons aussi rencontrées et qu'il est difficile d'expliquer.

Par ailleurs, il faut noter au cours de la réaction, la solubilité du phosphate de plomb dans le milieu contenant une solution tampon. Ces faits étudiés par Gomori (1949), semblent évitables :

— si le rapport du tampon au substrat est de un tiers pour le glycérophosphate;

— si la concentration en plomb de la solution du substrat est élevée, le phosphate de plomb formé est moins soluble.

Il n'en reste pas moins que les pertes d'activité enzymatique pendant la fixation et l'inclusion persistent et sont probablement dues au fait que la Ph acide existe sous forme de loenzyme soluble dans l'eau et dans l'alcool.

— LOCALISATION IN SITU. — Les deux problèmes posés par la localisation de la Ph alcaline se retrouvent pour la Ph acide :

— ce qui a été dit sur la fixation *in situ* de la Ph alcaline est applicable à la Ph acide;

— le phosphate de plomb semble bien précipité exactement à l'endroit de l'activité enzymatique; seulement Gomori (1950) fait remarquer que le temps d'incubation de la lame ne doit pas être trop prolongé sinon il se produit une légère diffusion de l'activité enzymatique.

c) *Conclusions* .

Ainsi discutées *les méthodes de Gomori et ses équivalents paraissent d'une grande valeur histochimique* car :

1° elles sont d'une spécificité indiscutable si l'on a soin d'opérer parallèlement sur des coupes témoins;

2° la diffusion de l'enzyme, quand elle existe, est toujours faible et à l'échelle cellulaire seulement; donc la fixation est satisfaisante;

3° si les manipulations produisent inévitablement une perte de l'activité enzymatique, on peut en opé-

rant d'une manière stéréotypée la considérer comme nulle, et les résultats sont de ce fait compatibles avec une recherche histochimique précise;

4° ici comme pour toute l'histochimie le principe de la positivité est toujours valable: tout résultat positif présente une valeur indéniable, les résultats négatifs ne prouvent rien.

## 4. Méthodes adoptées

a) **Fixation, inclusion et montage communs :**

Le fixateur choisi fut l'acétone glacé: 6 à 12 heures au réfrigérateur entre 0 et 6 degrés C. (l'acétone doit être strictement anhydre).

Déshydratation dans deux bains successifs d'acétone, une demi-heure chacun à la température de la pièce, puis deux bains d'alcool-éther (parties égales), une demi-heure chacun.

Immersion dans une solution de celloïdine à 2 % dans l'alcool éther, 6 heures au réfrigérateur.

Deux bains de chloroforme, un quart d'heure chacun.

Paraffine, une heure exactement à une température qui ne dépassera jamais 56° C.

Couper à 6 μ: toutes les coupes doivent avoir la même épaisseur pour que les résultats soient comparables.

Etendre les coupes sur un mélange: eau 4 p. + acétone 1 p.; n'employer la platine chauffante que si la coupe ne s'étale pas bien, sinon ne pas dépasser 50° C.

Sécher les lames à la température du laboratoire ou à la rigueur à l'étuve à 37° C.

Déparaffiner par le xylol, l'alcool butylique.

Protéger la coupe en la trempant dans une solution de celloïdine à 1 % dans l'alcool-éther.

Passer à l'eau.

b) **Réaction de la phosphatase alcaline :**

Deux lames seront utilisées:

— **Réaction.** — Plonger la lame dans la solution suivante de pH 9, préparée extemporanément:

| | |
|---|---|
| Glycérophosphate de soude 2 % ..... | 10 cc. |
| Diéthyl barbiturate de soude 2 % .... | 10 cc. |
| Chlorure de calcium à 2 % ..... | 5 cc. |
| Sulfate de magnésium à 2 % ..... | 2 cc. |
| Eau distillée q. s. ..... | 50 cc. |

Le temps d'incubation choisi doit être de deux heures exactement, à 37, 38° C.

Rincer la coupe à l'eau distillée, une minute au plus.

Immerger 5 minutes dans une solution à 2 % d'un sel soluble de cobalt (sulfate, nitrate, etc...).

Rincer à l'eau distillée une minute au plus.

Immerger dans une solution à 1 % de sulfhydrate d'ammonium ou de sulfure de sodium, 5 minutes.

Laver sous le robinet, une minute au plus.

Contraster le fond par l'éosine à 1/1000 dix secondes, il est inutile de colorer les noyaux.

Déshydrater, monter au baume.

— **Lame témoin.** — La plonger dans la solution incubatrice précédente dont on supprime le substrat (le glycérophosphate de soude), à la même température et pendant le même temps.

Les temps suivants sont identiques aux précédents.

c) **Réaction de la phosphatase acide:**

Deux lames seront utilisées:

— **Réaction.** — Les coupes déparaffinées seront incubees dans la solution suivante de pH 5, préparée extemporanément.

| | | |
|---|---|---|
| — Solution molaire d'acétate de soude ..... | | 2 cc. 5 |
| — acétate de soude 3 OH2 (3,6 %) .... | 100 cc. | |
| — acide acétique 6 % ..... | 50 cc. | |
| — Solution de nitrate de plomb à 5 % .... | | 1 cc. |
| — Eau distillée . ..... | | 50 cc. |
| — Solution de glycérophosphate de soude 3 % | | 5 cc. |

Cette solution est louche, la filtrer.

Le temps d'incubation choisi est de 16 h. exactement, à 37, 38° C.

Rincer à l'eau distillée, une minute au plus.

Rincer à l'acidé acétique à 10 %, une minute.

Laver à l'eau distillée, une minute au plus.

Immerger dans une solution de sulfure d'ammonium à 1 % ou de sulfure de sodium, 5 minutes.

Laver sous le robinet, une minute.

Contraster le fond par une solution d'éosine à 1/1.000, dix secondes.

Déshydrater, monter au baume.

— **Lame témoin.** — L'immerger dans la même solution précédente, dont on supprime le glycérophosphate de soude, pendant le même temps, à la même température.

Les temps suivants sont identiques.

d) **Les résultats** (1) :

Les colorations obtenues sont indéfiniment stables.

L'activité enzymatique se révèle par des colorations variant du brun-noir au noir franc.

Les lames témoins ne doivent révéler aucune activité pour que les résultats concomitants sur les lames normales aient de la valeur; nous avons systématiquement éliminé les lames dont les témoins présentaient une coloration parasite et nous n'avons retenu que celles dont la valeur histochimique nous était prouvée par des lames témoins incolorées.

## D) HISTOTOPOCHIMIE DES PHOSPHOMONOESTERASES HEPATIQUES

### 1. ETUDES ANTERIEURES.

Ce sont les auteurs qui ont décrit les techniques histochimiques concernant ces enzymes qui ont fait les premières descriptions topochimiques de ces enzymes dans le foie, mais leurs résultats sont brefs et sommaires.

— La distribution de la *Ph alcaline* du foie fut décrite par Takamatsu et Gomori en 1939 sur des foies animaux et humains, puis par Takamatsu et Otsuki en 1941.

Kabat et Furth font des études sur des tissus variés et néoplasiques en 1941.

Wachstein, en 1945, étudie la Ph alcaline des foies d'animaux soumis à des régimes divers et à des poisons variés; puis Wachstein et Zak dans l'obstruction biliaire expérimentale du chien.

Jacoby en 1947 se sert de la méthode de Gomori pour étudier les capillaires biliaires du rat.

---

(1) Nous nous permettons de rappeler à ce propos, que c'est en appliquant dans le laboratoire de Microbiologie de M. le Professeur Carrère ces diverses techniques à des frottis de Corynébactéries que nous avons découvert une nouvelle méthode de coloration des corpuscules métachromatiques, qui, outre sa valeur pratique, présente un grand intérêt théorique, relatif à l'interprétation du phénomène de la métachromasie.

Baud et Fulleringer décrivent à Lyon en 1948 les constituants enzymatiques de la membrane nucléaire de la cellule hépatique du cobaye et du rat.

Pearson et Morrione en 1949 notent les variations de cet enzyme dans la carcinogénèse expérimentale hépatique du rat par le diméthylaminoazobenzène.

Tout récemment, en 1952, Moyson étudie les variations de la Ph alcaline du foie de rat soumis à des chocs traumatiques expérimentaux.

Il y a bien d'autres publications encore que nous n'avons pas rapportées; nous terminerons avec une mention spéciale relative aux travaux portant sur les foies humains provenant d'autopsies ou de ponctions-biopsies, travaux dont nous ignorions l'existence au début de notre étude, mais qui se sont révélés pour nous d'un grand intérêt puisque nous avons pu ainsi comparer nos résultats.

Il s'agit des travaux de Sherlock et Walshe publiés en 1947, dans lesquels les auteurs étudient parallèlement la phosphatasémie alcaline, la bilirubinémie et les activités histochimiques phosphatasiques des fragments hépatiques prélevés par ponction-biopsie.

En 1949, Kritzler et Beaubien firent une étude analogue sur des foies humains prélevés par autopsie, et sur des foies d'animaux après obstruction biliaire expérimentale.

Enfin, Cleveland et ses collaborateurs publient en 1950, des études semblables sur des ponctions-biopsies de foie.

— Il y a peu de travaux sur la *Ph acide* hépatique, nous avons déjà mentionné la raison de ce silence.

Signalons cependant les résultats donnés par le promoteur de la méthode en 1941 (Gomori); puis ceux de Wolf, Elvin, Kabat, Newman et ceux de Baud et Fulleringer en 1948 susmentionnés. Enfin ceux de Rabinovitch sur le noyau de la cellule hépatique en 1949.

Il n'y a pas d'étude d'ensemble sur la Ph acide du foie humain normal et pathologique.

## 2. RESULTATS PERSONNELS SUR LA Ph ALCALINE DU FOIE HUMAIN NORMAL ET PATHOLOGIQUE.

### a) Foie normal

Cette étude a été effectuée sur 25 foies humains normaux, provenant d'adultes ou d'enfants, prélevés par ponction-biopsie et traités par la technique décrite supra.

Les malades qui les fournirent étaient atteints de maladies extra-hépatiques: encéphalites, pneumopathies, troubles digestifs, anorexies, eczéma, primo-infection, etc..., et les colorations standards décelaient par ailleurs un aspect histologique tout à fait normal.

— TOPOGRAPHIES.

Une vue d'ensemble d'une coupe de foie normal nous montre un tissu légèrement coloré en rose par l'éosine, sur lequel ressortent en brun-noir ou noir foncé les lieux d'activité enzymatique; les noyaux des cellules hépatiques tranchent nettement ainsi que leurs limites cellulaires finement ourlées. Les vaisseaux sanguins, artériels et veineux, sont très nettement dessinés dans les espaces-portes et les trajets zig-zaguant des sinusoïdes sont très reconnaissables par leur contenu noir moins accentué cependant dans la zone moyenne.

Ainsi l'activité phosphatasique alcaline permet une identification topographique des lobules hépatiques. (Photo 3.)

A un plus fort grossissement apparaissent les détails cellulaires.

— *Cellules hépatiques.* Elles montrent toujours une activité enzymatique au niveau de leur noyau mais rarement à l'intérieur de leur cytoplasme.

Dans le noyau, que l'enzyme délimite finement, les nucléoles sont plus fortement colorés, le réseau chromatinien n'est que faiblement dessiné et apparaît comme un fin filet; les caryosomes accusent aussi une nette activité enzymatique ainsi que la chromatine associée au nucléole.

La chromatine est donc moins riche en Ph alcaline que l'hé-

térochromatine nucléolaire, et la réaction de Gomori permet de différencier nettement les vrais nucléoles des caryosomes.

Le cytoplasme hépatique est très légèrement délimité, mais ne renferme que peu ou pas de Ph alcaline: il ne contient, et d'une façon inconstante d'ailleurs, que quelques granules noirs de topographie très variable avec parfois quelques amas de granulations près des canalicules intra-trabéculaires.

En examinant en détail les cellules des diverses zones on ne décèle pas de localisation lobulaire, tous les éléments cellulaires d'un même lobule semblent posséder la même activité cytoplasmique.

Par contre, on trouve certains noyaux plus riches en phosphatase, mais sans topographie particulière; dans les cellules binucléées on voit souvent un noyau plus foncé que l'autre, cette augmentation de l'activité enzymatique intéressant la membrane nucléaire, le réseau chromatinien et les nucléoles.

Pendant les mitoses, les chromosomes sont fortement teintés en noir; les nucléoles ont disparu et le cytoplasme est vide de toute activité enzymatique.

— *Sinusoïdes.* Ils révèlent des degrés variés d'activité enzymatique, mais ceux-ci ne sont jamais très importants.

A l'échelle lobulaire, ils présentent une topographie zonale constante: les sinusoïdes avoisinant la veine centrale d'une part, les espaces portes d'autre part sont les plus colorés et présentent la plus forte activité.

Celle-ci se traduit par un liseré plus ou moins large, d'autant plus épais que l'on se rapproche du centre ou de la périphérie du lobule pouvant dans certains cas obstruer complètement la lumière sinusoïdale; si bien que cette topographie périportale réalise un aspect typique en « tête de serpent ».

La cellule de Kupffer montre, elle aussi, une activité enzymatique constante au niveau de son noyau, intéressant le réseau chromatinien et surtout les nucléoles; son protoplasme présente aussi parfois quelques granulations enzymatiques non constantes.

Enfin la veine centrale montre un endothélium riche en Ph et permettant assez facilement de la découvrir dans la coupe.

— *Canalicules biliaires intra-cellulaires et intra-trabéculaires.* Ils montrent très souvent une activité enzymatique élevée, si bien que leur topographie et leur morphologie sont facilement identifiables.

Parfois punctiformes, parfois tubulaires, suivant l'incidence de la coupe, ils sont assez souvent intensément colorés en noir mais leur trajet irrégulier ne peut être suivi que par les variations de la mise au point.

D'autres fois leurs limites seules sont colorées et leur cavité vide.

Ils montrent souvent leur apparence tortueuse bien connue, dans certains endroits séparant deux rangées de cellules hépatiques, dans d'autres formant un réseau délimitant la cellule.

Des capillaires trabéculaires partent dans des angles variés des branches inter-cellulaires apparaissant comme de petits points ronds et noirs ou sous forme de cercles.

Ce n'est que rarement que l'on peut voir la transition entre les capillaires et les conduits biliaires.

Les canalicules intra-cellulaires périportaux ont une activité enzymatique peut-être un peu plus marquée que ceux des zones centrale et moyenne.

— *Espaces portes.* A leur niveau les endothéliums des veines portes sont très actifs; cette activité est constante et se traduit par un liseré noir plus ou moins épais.

Les artères hépatiques donnent des images semblables.

Les canaux ne montrent qu'une activité phosphatasique inconstante dans leur lumière, mais par contre le noyau de leurs cellules épithéliales est toujours coloré. et leur cytoplasme toujours dépourvu d'activité enzymatique.

Le tissu conjonctif périportal montre une activité nucléaire des fibroblastes jeunes mais peu d'activité cytoplasmique; par contre, le tissu conjonctif âgé formé de fibrocytes est toujours dépourvu de Ph cytoplasmique mais conserve des activités nucléaires.

Quant aux éléments sanguins des vaisseaux, les hématies sont dépourvues de toute activité, mais les noyaux des lymphocytes et des polynucléaires sont intensément colorés.

— *Phosphatasémie alcaline.* Dans tous les cas où nous avons pu avoir les taux phosphatasémiques correspondants, ceux-ci nous montraient des valeurs normales, légèrement supérieurs cependant pour les enfants, s'échelonnant entre 3 et 5 unités Bodansky.

— *En résumé,* une vue à faible grossissement d'une coupe de foie normal permet de repérer les veines centrolobulaires et les espaces portes par l'intense activité enzymatique des endothéliums vasculaires. Autour d'eux s'irradient les sinusoïdes dont les activités s'estompent peu à peu pour devenir nulles dans les zones intermédiaires.

Le parenchyme hépatique apparaît comme un fin carrelage de cellules, centrées par des noyaux fortement colorés.

Les aspects topochimiques de la Ph alcaline au niveau des foies adultes et infantiles sont identiques.

Les divers détails topographiques de cette distribution histochimique sont donnés dans le tableau n° 2 ci-joint.

Discussion.

— Gomori et Takamatsu décrivirent rapidement les topographies de la Ph alcaline du foie et sans beaucoup de détails. Takamatsu signale la présence de la Ph dans les cellules hépatiques et leur absence dans les cellules de Kupffer; Gomori, en 1941, décrit l'activité enzymatique des noyaux des cellules hépatiques, des sinusoïdes centro-lobulaires et périportaux et des capillaires biliaires.

Les nombreux auteurs qui se sont ultérieurement occupés de cette question sont d'accord sur les résultats d'ensemble, les divergences d'opinion ne portent que sur quelques détails.

Wachstein, Sherlock et Walshe notent la présence uniforme de l'enzyme dans les noyaux et les cytoplasmes des cellules hépatiques; par contre, Kritzler et Beaubien (1949), puis Cleveland et ses collaborateurs (1950), ne trouvent pas d'activité phosphatasique cytoplasmique hépatique, ce qui est en accord avec nos propres résultats.

Baud et Fulleringer notent la richesse de la membrane nu-

TABLEAU I. — PHOSPHATASES SPÉCIFIQUES D'UN TYPE DE LIAISON
(d'après ROCHE et COURTOIS modifié 1944).

| Nom-substrat | Type | pH | Source | Cinétique |
|---|---|---|---|---|
| Phosphomono-estérases (Monoesters de PO4 H3) | I. A 1 | 8,6-9,4 | Os, rein, foie, intestin, sein... | Activation par Mg ++ Mn ++.<br>Action préférentielle sur le bétaglycéro-phosphate.<br>Inhibition par SH, phloridzoside.<br>Stable en milieu NH4, non en milieu acétique. |
| | II. A 2 | 5,0-5,6 | Foie, graines, rate, champignons... | Pas d'action de Mg ++.<br>Inhibition par F-.<br>Stable en milieu acétique, non en milieu NH4. |
| | III. A 3 | 3,8-4,2 | Foie, son de riz, champignons, levures. | Inhibition par Mg ++.<br>Stable en milieu acétique, non en milieu NH4. |
| | IV. A 4 | 5,0-6,4 | Hématies, levures. | Activée par Mg ++ et Mn ++.<br>Action préférentielle sur l'alpha-glycérophosphate. |
| Phosphodi-estérases (Diesters de) PO4 H3 | I<br>II<br>III? | 8,5-9,0<br>5,5<br>4,0 | Venins serpents, rein, intestin.<br>Champignons, son riz, foie, moisissure animale. | |
| Pyrophosphatases (sels et esters de l'acide pyrophosphorique) | I | 7,4-8,2 | Intestin, rein, foie. | Activation par Mg ++ Mn ++.<br>Stable en milieu NH4, non en milieu acétique. |
| | II | 5,2-6,0 | Foie, levures, hématies, graines | Activation par Mg ++.<br>Inhibition par F-.<br>Stable en milieu acétique non en milieu NH4. |
| | III | 3,2-4,0 | Graines, foie, levures, champignons | Inhibition par F-. |
| Phosphamidases (amides de PO4 H3) | I<br>I<br>III | 9<br>5,2<br>3 | Rein.<br>Son de riz.<br>Rein. | |

cléaire de la cellule hépatique en divers enzymes, notamment en Ph alcaline.

La richesse en Ph alcaline des chromosomes des cellules en mitose fut aussi signalée par Chevremont et Firket, en 1949.

De légères divergences se retrouvent pour les capillaires biliaires intra-trabéculaires et intra-cellulaires que Gomori (1941), Deane (1947), Wachstein et Zak (1946), Jacoby (1947), Sherlock et Walshe (1947), Sulkin et Gardner (1948), Kritzler et Beaubien (1949), Cleveland et coll. (1950), trouvent constamment positifs. Seul Bourne (1943), nie toute activité phosphatasique des capillaires biliaires humains.

Quant aux sinusoïdes, Takamatsu (1939), Kabat et Furth (1941), Cleveland et coll. (1950) ne trouvent pas d'activité enzymatique dans les cellules de Kupffer ce qui est contredit par la majorité des auteurs: Jacoby, Deane, Sherlock et Walshe, Cleveland et par nous-même.

La présence d'enzymes au niveau des noyaux des éléments sanguins polynucléaires, lymphocytes, avait été déjà signalée par Wislocki et Dempsey, Waschtein (1946), Rabinovitch et Andreucci (1949), ainsi que dans ceux des fibroblastes par Wilmer (1942), Chevremont et Firket (1949).

Tous les auteurs qui ont dosé parallèlement la phosphatasémie alcaline des sujets présentant un foie histologiquement normal (Sherlock, Kritzler, Cleveland), sont d'accord pour reconnaître la concordance entre les taux normaux de Ph alcaline sérique et une répartition histochimique de cet enzyme concordant avec les nôtres.

— De tout ce qui précède on pourrait conclure que l'irrégularité, l'inconstance des résultats obtenus ne permettent pas de tirer des conclusions stables des méthodes histochimiques de détection de la Ph alcaline. Il n'en est rien.

Il est en effet certain que le tableau que nous donnons n'est qu'une moyenne établie sur plusieurs dizaines de foies normaux examinés, il y a de petites variations d'un prélèvement à l'autre mais la topographie reste absolument identique, seul le degré d'activité enzymatique varie très légèrement.

Quant aux divergences d'opinions précédemment citées, elles

proviennent toutes du fait que les auteurs n'emploient pas des techniques identiques: les fixations, inclusions, colorations, temps de lavage, influent sur la solubilité des différents produits chimiques intermédiaires formés.

C'est ce que nous avons discuté dans le paragraphe concernant la valeur histochimique des méthodes.

*Les techniques de la plupart des histologistes précités ne tiennent pas toujours compte des critères histochimiques d'où il s'ensuit des divergences relatives de topographie.*

Enfin, il faut tenir compte du temps d'incubation: si on laisse en effet incuber une coupe de foie à des températures différentes et pendant des délais plus longs on obtient des images différentes. C'est ainsi que la comparaison des photos 1 et 2, illustre bien ce fait: deux lames d'un même prélèvement incubées, l'une pendant 1 heure, l'autre pendant 20 heures, montrent des localisations fort différentes: la Ph se trouve dans les sinusoïdes et le protoplasme des cellules hépatiques d'une manière diffuse dans le prélèvement incubé pendant 20 heures; la chromatine nucléaire montre une activité accrue tandis que les nucléoles sont dépourvus d'enzyme, les canalicules biliaires sont finement délimités mais leur lumière est toujours vide de Ph. L'interprétation est claire: il y a eu diffusion de l'enzyme.

Or, les travaux précités emploient des temps d'incubation des plus variables, 1 heure, 2 h., 3 h., 14 h., etc...; il en résulte des descriptions divergentes et parfois contradictoires, ce qui ne peut nous étonner.

### Conclusions.

De la détection histochimique de la Ph alcaline du foie humain normal, nous pouvons conclure :

1° Que l'activité phosphatasique alcaline du foie humain est faible par rapport à celle de certains organes: zone corticale du rein, intestin, os...;

2° Que cette activité révèle une topographie identique et superposable pour tous les foies adultes et infantiles, avec de légères variations portant non

sur de nouvelles localisations mais sur des degrés d'activité;

3° Que les divergences de description concernant cette activité sont dues à des divergences de technique. D'où découle le corollaire formel que des études comparatives ne peuvent être établies que sur des résultats obtenus par des techniques identiques.

## b) Foies pathologiques

Notre analyse a porté sur 60 P. B. F. pathologiques, adultes et infantiles.

Conformément aux conclusions précédentes, nous avons employé les techniques judicieusement fixées antérieurement décrites.

Avant d'aborder les maladies hépatiques, nous décrirons les activités enzymatiques dans les lésions élémentaires de la cellule hépatique (C. H.).

### 1. La Ph alcaline dans les lésions élémentaires de la cellule hépatique.

*Surcharges.* — La C. H. en surcharge graisseuse conserve son activité phosphatasique nucléaire mais son cytoplasme ne montre que peu ou pas de granulations enzymatiques.

— En surcharge glycogénique, comme nous l'avons observé dans quelques cas de polycorie ou de diabète, la C. H. n'accuse aucune modification de son activité cytoplasmique comme on pourrait s'y attendre; par ailleurs, son activité nucléaire est normale.

— La C. H. en surcharge pigmentaire révèle une légère augmentation de l'activité enzymatique cytoplasmique en relation ou non avec les pigments biliaires qu'elle contient.

*Dégénérescence et nécrose.* — Le cytoplasme est le premier à perdre les quelques granules enzymatiques qu'il peut contenir tandis que le noyau semble conserver, du moins au début, toute son activité enzymatique. (Photo 4.)

Dans la pycnose, le noyau paraît homogène et se révèle par une coloration noire foncée diffuse, peut-être par augmentation de son activité enzymatique ou bien par concentration de ses constituants.

Dans la caryolyse, la coloration du noyau est beaucoup plus pâle et s'estompe graduellement.

*Anomalies nucléolaires* (1). — Signalons au niveau des nucléoles anormaux (anomalies portant sur la taille et la forme), une activité phosphatasique conservée.

Dans les nucléoles vacuolaires, la Ph est toujours présente au niveau des ribonucléoprotéines nucléolaires du premier stade, ainsi qu'au niveau des désoxy et ribonucléoprotéines du deuxième stade, et ourle délicatement la vacuole centrale absolument vide d'enzyme même lorsqu'elle contient du glycogène. (Photo 5.)

### 2. La Ph alcaline dans les foies pathologiques .

Cette étude ne pouvant être effectuée que sur des P. B. F. extemporanées et non sur des lames montées anciennes, il aurait fallu poursuivre ces recherches pendant plusieurs années pour obtenir une gamme complète d'affections hépatiques. Nous avons eu cependant la bonne fortune, pendant le cours de notre travail, de rencontrer les affections hépatiques les plus intéressantes.

a) *Hépatite épidémique.*

A un examen superficiel, les sinusoïdes apparaissent plus colorés d'une manière plus constante, on retrouve cependant la disposition zonale des foies normaux mais plus atténuée. (Photo 4.)

Examinons les détails à un plus fort grossissement :

— *Cellule hépatique.* — La C. H. morphologiquement intac-

(1) Les anomalies nucléolaires de la cellule hépatique humaine seront longuement décrites dans le paragraphe correspondant du chapitre 2 concernant l'histochimie de nucléoprotéines et acides nucléiques hépatiques.

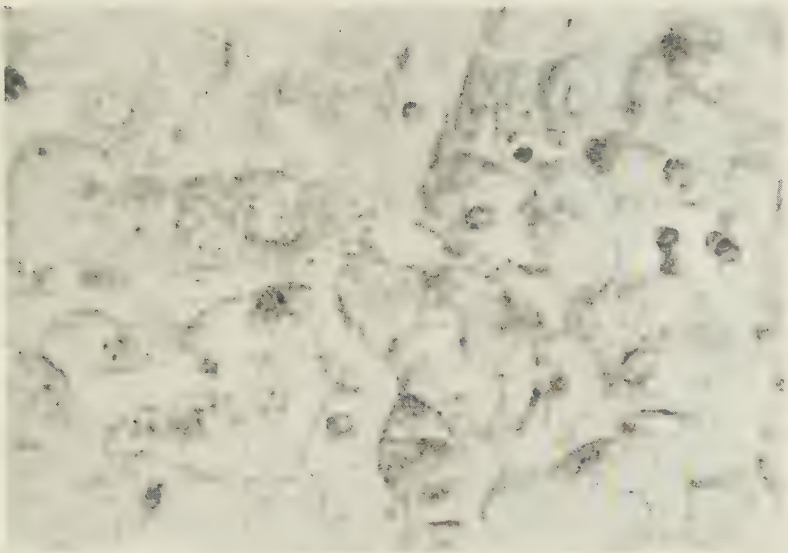


**PHOTO 5. — Nucléoles vacuolaires. Phosphatase alcaline** (incubation 2 h.)

Vacuoles nucléaires finement ourlées par les deux liserés enzymatiques chromatiniens. Noter la richesse en enzyme des nucléoles, et la présence intracytoplasmique de la phosphatase sous forme d'un fin granité. L'intérieur des vacuoles nucléolaires ne contient pas d'enzyme. Les canalicules biliaires intra et intercellulaires sont visibles.

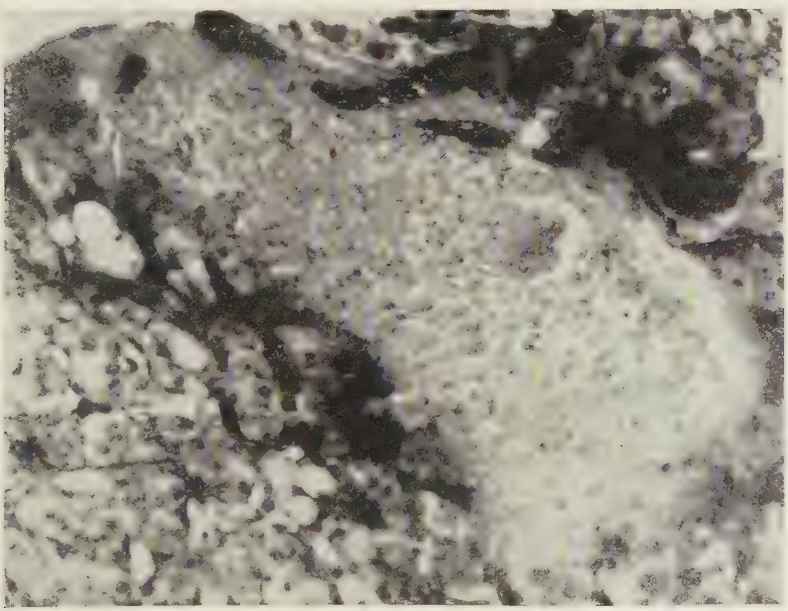


**PHOTO 6. — Hépatite tuberculeuse. Phosphatase alcaline** (incubation 2 h.)

Follicule de Köster au voisinage duquel les sinusoïdes présentent une forte activité enzymatique. Seuls les noyaux des constituants cellulaires du follicule sont visibles. Remarquer la cellule de Langhans vide d'enzyme avec ses nombreux noyaux finement délimités.

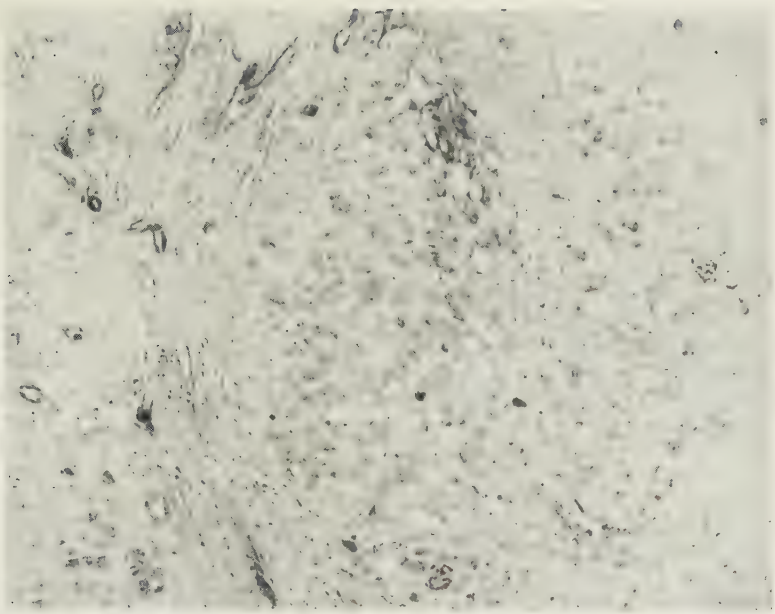


**PHOTO 7. — Cirrhose avec activité enzymatique normale.**
**Phosphatase alcaline** (incubation 2 heures)

Remarquer les vaisseaux sanguins enserrés dans la fibrose et leur forte activité phosphatasique, et les néocanalicules biliaires se détachant chant à l'emporte-pièce.

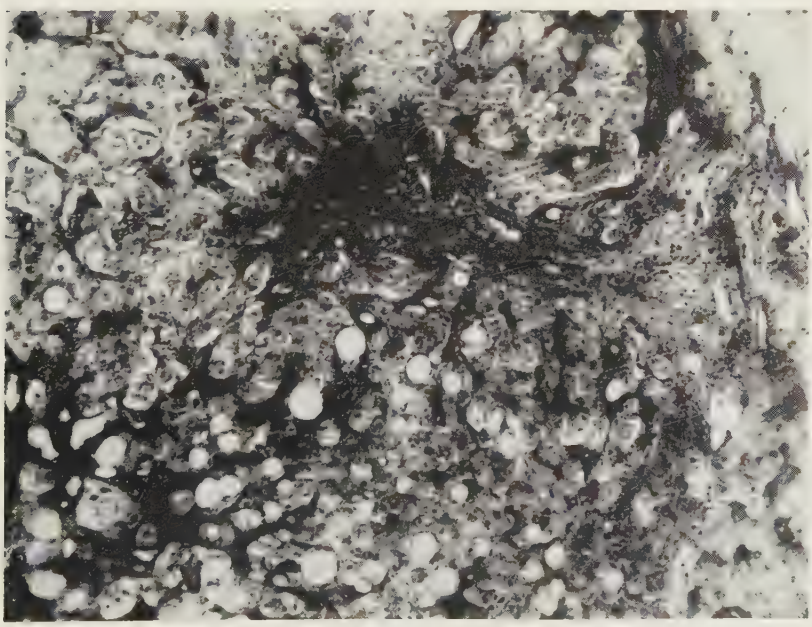


**PHOTO 8. — Cirrhose avec forte activité enzymatique**
**Phosphatase alcaline** (incubation 2 heures)

La topographie enzymatique lobulaire est moins nette. La forte activité phosphatasique des sinusoïdes obscurcit tout détail cytologique des cellules adjacentes. Noter l'activité des cellules hépatiques se révélant sous forme d'une fine granulation cytoplasmique.

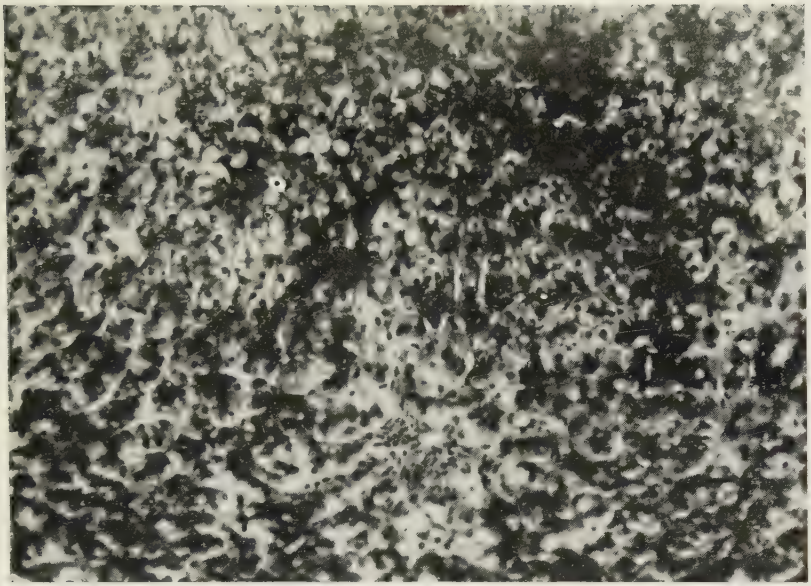


**PHOTO 9. — Foie normal. Phosphatase acide** (incubation 16 heures)

Activité enzymatique normale. Pas de disposition zonale. L'activité protoplasmique des cellules hépatiques est très variable. Comparer cet aspect avec la photo 3. Tous les noyaux cellulaires contiennent l'enzyme.

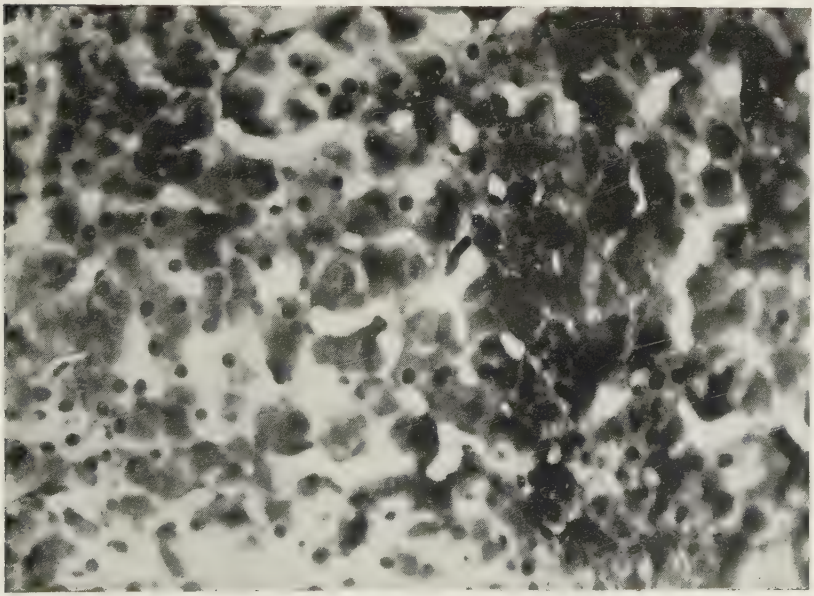


**PHOTO 10. — Foie normal. Phosphatase acide** (incubation 16 heures)

Activité enzymatique normale. Noter la richesse de tous les noyaux, la vacuité enzymatique absolue des sinusoïdes légèrement dilatés et des canalicules biliaires, et les variations de la charge cytoplasmique enzymatique des cellules hépatiques.

te révèle son activité habituelle nucléaire, mais ici les noyaux sont plus intensément colorés, les nucléoles plus foncés et le réseau chromatinien mieux dessiné. Les granules enzymatiques cytoplasmiques sont dans l'ensemble plus nombreux et plus colorés, surtout dans les cellules contenant des pigments biliaires.

La C. H. en dégénérescence ou nécrosée ne révèle aucune activité cytoplasmique, son noyau conserve dans un premier stade toute son activité, ultérieurement il devient plus pâle et finit par disparaître.

— *Sinusoïdes.* — C'est sur eux que porte l'augmentation de l'activité enzymatique au premier chef. Cette activité est plus diffuse que normalement, et plus élevée dans les régions centrale et périphérique du lobule, si bien qu'ils ne sont pas seulement ourlés comme dans les foies normaux mais montrent une activité enzymatique dans toute leur lumière pouvant diffuser sur les travées cellulaires voisines et obscurcir les détails des cellules contiguës.

A noter aussi la richesse particulière des sinusoïdes au voisinage des éléments cellulaires nécrosés.

La veine centrale est constamment colorée.

Les infiltrats sanguins: lymphocytes, polynucléaires et plasmocytes montrent leur habituelle activité nucléaire.

— *Canalicules biliaires.* — Ils ne diffèrent pas beaucoup de ceux rencontrés dans les foies normaux. Ils sont parfois colorés mais sont toujours minces, de calibre égal.

En général, les trombi biliaires apparaissent colorés en jaune ou en brun-vert, mais peuvent parfois révéler une intense activité enzymatique, surtout en leur centre.

— *Espaces portes.* — Il y a augmentation du degré d'activité des triades portes.

L'endothélium de la veine porte et des artères hépatiques décèle une activité supérieure à la normale.

Les canaux biliaires ne montrent qu'une faible activité localisée surtout au noyau de leurs cellules épithéliales.

Le tissu conjonctif âgé, formé de fibrocytes, ne révèle qu'une faible activité nucléaire mais jamais d'enzyme cytoplasmique.

Les infiltrations cellulaires portales révèlent une activité au niveau des noyaux des histiocytes, des lymphocytes et des polynucléaires; les mastocytes, lorsqu'ils existent, se révèlent par un fin piqueté cytoplasmique de Ph alcaline correspondant à leurs granulations métachromatiques et une activité enzymatique nucléaire.

— *Conclusions.* — L'hépatite épidémique se caractérise donc donc par une augmentation de l'activité enzymatique des sinusoïdes et des vaisseaux sanguins.

b) *Hépatite tuberculeuse: miliaire.*

L'aspect général du foie est le même que celui de l'hépatite épidémique: augmentation générale de l'activité enzymatique. Notons cependant que la richesse des sinusoïdes en Ph est moins uniforme et moins forte.

Ce qui frappe le plus dans ces coupes, c'est l'aspect des *follicules de Kôster.* (Photo 6.)

Il est difficile de les repérer à faible grossissement; bien qu'ils tranchent légèrement sur le fond de la préparation par leur couleur homogène rose éosine, on ne peut les différencier des espaces portes légèrement fibreux que par l'absence complète de cavités vasculaires.

C'est donc l'absence de toute activité enzymatique qui caractérise le follicule tuberculeux.

Examinés à un fort grossissement, on ne peut y distinguer que de légères activités nucléaires mais aucune activité cytoplasmique, si bien que les limites cellulaires sont imprécises et qu'on ne peut identifier les éléments cellulaires que par les noyaux.

Les multiples noyaux de la cellule de Langhans présentent une légère activité chromatinienne et une activité nucléolaire plus forte, mais pas d'enzyme cytoplasmique.

Les cellules épithélioïdes, histiocytes, plasmocytes, lymphocytes ont des noyaux finement dessinés.

*Les cellules hépatiques* présentent une activité légèrement augmentée au niveau de leurs noyaux.

La surcharge graisseuse des cellules parenchymateuses n'altère en rien leur activité nucléaire.

Notons en terminant la forte activité *des sinusoïdes* avoisinant les follicules et les espaces portes.

Nous n'avons pas eu la chance de rencontrer de tubercules et nous ne savons donc pas si le caséum contient ou non de Ph alcaline.

c) *Ictère par rétention et stase biliaire.*

Les coupes présentent un aspect général à peu près identique; bien que l'activité enzymatique des sinusoïdes soit augmentée d'une manière diffuse, la topographie zonale est conservée.

— *La cellule hépatique* montre parfois des granulations enzymatiques protoplasmiques plus nombreuses que normalement; les granulations biliaires intracellulaires sont colorées de façon variable: du brun foncé au noir franc.

Son noyau montre une légère hyperactivité au niveau de tous ses constituants.

— *Les sinusoïdes* sont intensément colorés, surtout aux deux poles du lobule; leur lumière est souvent entièrement obscurcie. Les cellules de Kupffer révèlent une intense activité nucléaire, et parfois cytoplasmique.

— *Les canalicules biliaires.* C'est à leur niveau que porte la différence d'avec les foies normaux: en effet, ils révèlent une activité enzymatique supérieure à la normale; celle-ci intéresse tous les canalicules lobulaires qui sont plus distendus que dans les prélèvements normaux.

Les pigments biliaires amorphes ou organisés en thrombi, sont particulièrement riches en Ph alcaline. Lorsque l'obstacle biliaire est levé l'activité diastasique des thrombi persiste.

Les C. H. en nécrose contenant une poussière de pigments biliaires ont encore une légère activité nucléaire, et les pigments qu'elles renferment révèlent aussi la présence de l'enzyme.

— *Les espaces portes.* L'épithélium des canaux biliaires contient l'enzyme au niveau des noyaux des cellules épithéliales qui le constituent; et parfois les bouchons de bile intracanaliculaires révèlent une activité enzymatique. Les endothéliums des veines portes et des artères hépatiques ont un liseré enzymatique.

Les infiltrats leucocytaires et les fibroblastes portaux ont l'activité normale sus-mentionnée.

— *Conclusions.* — La détection de la Ph alcaline dans les cas de stase biliaire d'origine diverse, permet de révéler celle-ci, en mettant en évidence la dilatation des canalicules biliaires, consécutive à une obstruction à l'élimination de la bile.

d) *Cirrhoses.*

Nous pouvons distinguer deux cas: cirrhoses actives, cirrhoses inactives.

— *Cirrhoses inactives.* — L'activité phosphatasique globale n'est pas augmentée; l'aspect est celui d'un foie normal en ce qui concerne les cellules parenchymateuses, les sinusoïdes et les canalicules biliaires. (Photo 7.)

Signalons cependant les bandes de tissu fibreux qui se détachent très nettement sur le fond de la préparation par l'absence totale d'activité enzymatique cytoplasmique, seuls les noyaux présentent une légère réaction enzymatique nucléaire visible seulement à un plus fort grossissement.

A l'intérieur de ce tissu fibrocytique, les artères et les veines portes se détachent à l'emporte-pièce par leurs endothéliums colorés, mais les néocanalicules biliaires ne révèlent qu'une activité enzymatique au niveau des noyaux des cellules épithéliales qui les constituent.

— *Cirrhoses actives.* — Ce qui frappe le plus, c'est l'augmentation de l'activité des sinusoïdes mais il n'y a pas de variation dans la distribution globale. (Photo 8.)

La C. H. montre comme toujours une activité nucléaire constante et parfois une activité cytoplasmique dont la surcharge graisseuse n'en modifie pas le degré.

Les sinusoïdes montrent une activité accrue généralisée mais surtout périportale et souvent à un point tel qu'elle obscurcit tout détail cellulaire voisin.

Les canalicules biliaires et les canaux biliaires montrent une activité normale.

Les vaisseaux sanguins centro-lobulaires et portaux révèlent une activité enzymatique supérieure à la normale.

Le tissu fibreux jeune fibroblastique montre une activité nucléaire et cytoplasmique qui tranche nettement sur les lobules hépatiques et les délimitent avec précision.

— *Conclusions.* — Il y a augmentation de l'activité enzymatique sinusoïdale dans les cirrhoses actives seulement.

e) *Epithéliomas.*

Nous avons eu la bonne fortune d'avoir deux prélèvements de néoplasme primitif du foie :

— un cas d'épithélioma pseudo-acineux chez un enfant ;

— un cas d'épithélioma trabéculaire chez un adulte.

L'organisation générale du foie était conservée dans les deux cas, peut-être un peu plus profondément modifiée dans le premier, mais rappelant toujours histologiquement l'architecture hépatique.

Cytologiquement les C. H. ne présentent pas d'atypies nucléaires mais de simples variations morphologiques traduisant une multiplication active: prédominance nette de cellules binucléées, nombreuses amitoses et quelques mitoses, une anisocaryose énorme, une surcharge cytoplasmique en pigments biliaires et quelques nucléoles vacuolaires.

La topographie générale de la Ph alcaline est identique à celle du foie normal, notons cytologiquement la richesse des noyaux hépatiques et de leurs nucléoles et surtout l'intense activité phosphatasique des pigments biliaires intra-cellulaires et des thrombi biliaires.

Les zones de nécrose ne montrent aucune activité enzymatique.

— *Conclusion.* — L'activité phosphatasique des épithéliomas hépatiques est identique dans l'ensemble à celle des foies normaux. Seules les cellules néoplasiques hépatiques présentent une activité nucléaire supérieure à la normale.

### 3. Discussion.

Elle porte à la fois sur les lésions élémentaires et sur les descriptions topographiques générales ; il est en effet intéressant de comparer nos résultats avec les travaux antérieurs sur la même question.

#### a) *Lésions élémentaires.*

Nos descriptions de l'activité enzymatique des cellules hépatiques stéatosiques coïncident avec celles de Sherlock, Kritzler et Cleveland et celles de Fawcet (1949).

Il n'y a pas de description antérieure concernant la surcharge glycogénique de la C. H.

L'activité phosphatasique des C. H. en dégénérescence et en nécrose a donné lieu à des descriptions très différentes. Takamatsu et Otsuki (1941) notent l'activité enzymatique cytoplasmique des C. H. animales en nécrose; fait qui fut confirmé par Sherlock et Walshe en 1947 sur les C. H. du foie humain, et par Kritzler et Beaubien en 1949.

Par contre, d'autres auteurs tels que Wachstein en 1945 et Wachstein et Zak en 1946, travaillant expérimentalement sur des animaux soumis à des toxines cytoplasmiques ne notent aucune augmentation de la Ph alcaline dans la C. H. dégénérée ou en nécrose; ceci fut confirmé par Cleveland et coll. (1950) et est en accord parfait avec nos propres résultats.

Il semble que la présence d'une forte activité enzymatique à l'intérieur des cellules hépatiques nécrosées soit en rapport avec une incubation trop longue des coupes qui était souvent de l'ordre de 12 à 14 heures, d'où diffusion possible de l'enzyme des sinusoïdes voisins.

Mais tous les auteurs sont d'accord sur la présence de la Ph alcaline dans les noyaux pycnotiques ainsi que Chevremont et Firket l'ont démontré en 1949.

b) *Description topographique des foies pathologiques.*

Les études antérieures à la nôtre ont porté sur des maladies du foie parfois identiques, et dans ce cas il est intéressant de comparer les résultats décrits avec les nôtres, mais portent parfois sur des maladies que nous n'avons pas eu l'occasion d'observer et que nous rapporterons sans commentaire.

— *Hépatites aiguës.* — Takamatsu en 1939 décrivit le premier l'augmentation de l'activité enzymatique des C. H. humaines présentant des lésions diverses mais il ne donne aucun détail.

Par contre, Sherlock et Walshe (1947) et Cleveland et coll. (1950) décrivent dans les hépatites aiguës infectieuses des topographies tout à fait comparables avec celles que nous avons décrites. Par ailleurs, ces premiers auteurs ont noté une augmentation parallèle de la phosphatasémie alcaline, cette augmentation simultanée des deux activités enzymatiques croissant avec la sévérité de l'hépatite et diminuant à la convalescence.

La présence de l'enzyme au niveau des granulations métachromatiques des mastocytes avait été signalée par Noback (1946), Noback et Montagna (1946), Paff et coll. (1947) et Ribey et coll. (1949).

— *Miliaires hépatiques.* — Tadao-Takeuchi et Takamatsu en 1939 puis Prina en 1951, notent les mêmes résultats que nous, concernant la distribution générale et l'activité enzymatique du follicule de Kôster. Ayant étudié par ailleurs les tubercules, ils remarquèrent que l'enzyme est le plus souvent absent de la portion centrale du caséum mais il est présent dans les zones périphériques de celui-ci, ce que les auteurs interprètent comme des foyers possibles de précipitation calcique.

— *Stase biliaire par obstruction.* — Les auteurs antérieurs ont toujours observé une augmentation de la Ph alcaline dans les lieux de stagnation biliaire.

Wachstein et Zak (1946), et Kritzler et Beaubien (1949), par production d'obstruction biliaire expérimentale du chien et du chat démontrent la dilatation des capillaires biliaires et une

augmentation du nombre de granulations enzymatiques cytoplasmiques des C. H.

Jacoby (1947), employant le foie de rat trouve une remarquable augmentation de l'enzyme dans les canalicules biliaires dans l'ictère par rétention.

Chez l'homme l'activité enzymatique des pigments et des thrombi biliaires est plus discutée; si Sherlock et Walshe trouvent l'enzyme au niveau des thrombi biliaires, Wachstein et Zak, Cleveland et coll. n'en trouvent pas. Cela ne nous étonne pas car nous avons vu que l'activité enzymatique des pigments biliaires et des thrombi est très variable d'un prélèvement à l'autre.

Mais l'unanimité des auteurs est parfaite quand il s'agit de noter l'augmentation parallèle de la phosphatasémie alcaline.

— *Cirrhoses.* — Kritzler et Beaubien (1949) d'une part, Wachstein et Zak (1950) d'autre part, notent une augmentation de l'enzyme dans les cirrhoses biliaires expérimentales.

En ce qui concerne le foie humain les travaux de tous les auteurs concordent avec nos propres descriptions.

— *Epithéliomas hépatiques.* — Pearson et Morrione (1949) dans la carcinogénèse expérimentale du rat par le paradiméthylamino-azobenzène ne notent une élévation marquée de la Ph alcaline que dans les cellules sinusoïdales des cystadénomes, c'est-à-dire dans les cellules d'origine biliaire.

Cleveland et coll. (1950), notent une distribution enzymatique tout à fait comparable à la nôtre dans les épithéliomas hépatiques humains.

— *Maladies osseuses généralisées.* — Sherlock et Walshe (1947) ont étudié histochimiquement la Ph alcaline du foie humain dans la maladie de Paget, les carcinomes prostatiques et bronchiques avec métastases osseuses. Ils ont trouvé, parallèlement à une hyperphosphatasémie alcaline, une augmentation de l'enzyme hépatique dans les sinusoïdes, les canalicules biliaires et le cytoplasme de la C. H. Un traitement par les oestrogènes d'un cas de carcinome prostatique fit baisser les Ph alcalines hépatique et sérique.

4. Conclusions.

Les résultats obtenus par les divers auteurs qui se sont occupés de la détection histochimique de la Ph alcaline de foies humains pathologiques concordent parfaitement avec les nôtres.

Ce qui nous prouve qu'un dosage semi-quantitatif de cet enzyme est possible et n'est pas plus aléatoire que l'estimation de la charge glycogénique, pourvu que les méthodes employées obéissent à des critères histochimiques rigoureusement établis et à des conditions techniques absolument identiques.

Nous pouvons en tirer les conclusions suivantes :

a) *Dans les hépatites aiguës,* il y a une augmentation marquée de l'activité enzymatique au niveau des sinusoïdes et aussi, mais à un degré plus faible, au niveau de la C. H. (noyau et cytoplasme), des canalicules biliaires et des vaisseaux sanguins.

Ce qui cadre avec une augmentation moyenne de la phosphatasémie alcaline; cette augmentation simultanée des deux dosages croît avec la sévérité de l'hépatite et diminue à la convalescence parallèlement à la régression des lésions histologiques (Sherlock et Walshe).

b) *Dans les cirrhoses hépatiques actives* l'enzyme augmente dans les sinusoïdes, tandis que dans les *cirrhoses inactives* l'activité enzymatique du tissu hépatique est normale comme la phosphatasémie alcaline.

Le tissu fibreux présente toujours une activité nucléaire, mais seuls les fibroblastes contiennent des granulations enzymatiques cytoplasmiques.

c) *Dans les ictères par rétention,* l'augmentation de l'activité enzymatique est à son maximum dans les canalicules biliaires, et à un moindre degré dans la C. H. et les sinusoïdes. La phosphatasémie alcaline est dans ces cas toujours très élevée.

d) *Dans les maladies osseuses généralisées* (Sherlock et Walshe), il y a une augmentation globale de la Ph alcaline au

niveau des sinusoïdes, des canalicules biliaires et des C. H. avec augmentation de la phosphatasémie alcaline.

e) *Dans les épithéliomas hépatiques* la distribution de la Ph alcaline est normale, seule la C. H. néoplasique accuse une activité nucléaire supérieure à la normale.

Dans tous les cas énumérés il y a un accord satisfaisant entre les données purement chimiques concernant la phosphatasémie alcaline et les données histochimiques concernant la Ph alcaline hépatique.

Nous résumons dans le tableau n° 2 les variations histochimiques de cet enzyme au niveau des foies pathologiques.

Nous voyons donc que les essais de détection de la Ph alcaline n'apportent qu'une aide bien faible à l'histopathologiste dans le diagnostic différentiel des maladies hépatiques. *Le problème morphologique important est l'interprétation des ponctions-biopsies pour distinguer entre ictère par obstruction et ictère par hépatite;* dans la majorité des cas la structure histologique détectée avec les méthodes usuelles de coloration est suffisamment nette pour permettre une différenciation. Mais dans les cas rares où l'histologie habituelle sera impuissante, la détection histochimique de la Ph alcaline peut aider l'histopathologiste.

Ces investigations posent par ailleurs des *problèmes intéressants l'histophysiologie* et que nous examinerons dans la troisième partie de notre travail.

## 3. RESULTATS PERSONNELS SUR LA Ph ACIDE DU FOIE HUMAIN NORMAL ET PATHOLOGIQUE

### a) Foie normal

Cette étude a porté sur les mêmes prélèvements de foies normaux qui nous avaient servi pour la détection de la Ph alcaline.

— Topographies.

Une vue d'ensemble d'une coupe de foie colorée par la mé-

thode acide de Gomori, révèle une forte richesse enzymatique par comparaison aux coupes colorées par la méthode alcaline, et qui ne révèlent sur un fond homogène et éosinophile que les noyaux cellulaires et quelques vaisseaux sanguins. Ici, par contre, on trouve des images où la coloration noire domine; mais la grande différence se révèle surtout dans les vaisseaux sanguins dont la vacuité enzymatique est absolue. (Photo 9.)

Examinons les détails à un plus fort grossissement. (Photo 10.)

— *Cellules hépatiques.* — La richesse des cellules nobles en Ph acide contraste avec sa pauvreté en Ph alcaline.

Si l'incubation de la lame est poussée trop longtemps, il se produit des phénomènes de diffusion et les C. H. prennent l'aspect d'un bloc de charbon, aussi avons-nous choisi un délai optimum de 16 heures, dans ces conditions on trouve la Ph acide dans les noyaux et les cytoplasmes de C. H. en quantité appréciable, mais les détails cellulaires sont toujours très facilement lisibles.

Le noyau a le même aspect morphologique qu'avec la réaction alcaline. La membrane nucléaire est cependant ici plus riche en enzyme et forme un anneau noir délimitant les structures nucléaires; le réseau chromatinien est finement dessiné et apparaît sous forme d'un filet présentant des renflements correspondant aux caryosomes.

Les nucléoles par contre ne présentent pas d'activité enzymatique et se détachent en négatif sur les structures nucléaires colorées; lorsqu'ils sont associés à des blocs ou à des anneaux de chromatine ils apparaissent sous forme de vacuoles optiquement vides ourlées délicatement par la chromatine périphérique. L'hétérochromatine nucléolaire se distingue donc aisément de l'euchromatine par l'absence de Ph acide.

Le cytoplasme des C. H. est très légèrement délimité mais sa richesse en Ph acide contraste particulièrement, et ceci d'une façon constante, avec sa pauvreté en Ph alcaline.

Cette activité photoplasmique apparaît sous des formes variées, parfois se révélant en flaques, parfois sous l'apparence de grosses granulations d'un noir d'encre. La topographie de

cette activité est très variable, soit périnucléaire, soit dans la zone intermédiaire de la cellule, soit diffuse à tout le cytoplasme, elle peut aussi se limiter au cytoplasme péricanaliculaire ou parasinusoïdal: il n'y a donc pas de topographie élective de l'activité phosphatasique acide cytoplasmique.

A noter cependant certains aspects punctiformes paranucléaires de l'activité enzymatique qui font penser à une localisation Golgienne possible.

Enfin certaines C. H. possèdent une faible charge enzymatique cytoplasmique mais elles sont rares.

En examinant les diverses zones du lobule on ne décèle pas de modification zonale apparente, toutes les C. H. paraissent posséder *grosso modo* une activité, sinon égale, du moins comparable.

Par contre, on trouve certains noyaux hépatiques plus riches en Ph acide, dans les cellules binucléées on remarque souvent un noyau plus riche que son voisin, cette richesse pouvant se traduire par une coloration noire diffuse à toute l'aire nucléaire et il semble que les noyaux les plus riches possèdent les plus gros nucléoles. (Photo 11.)

Mais cette activité enzymatique n'intéresse que l'euchromatine, les nucléoles ne présentant jamais de réaction positive; ils peuvent cependant à un faible grossissement paraître contenir de la Ph acide, mais il est toujours loisible de constater à un grossissement plus élevé et en faisant varier la mise au point, qu'ils sont vides de toute activité diastasique et que la coloration noire qu'ils peuvent présenter n'est due qu'à la chromatine associée au nucléole sus et sous-jacente.

Dans la cellule en mitose, les chromosomes sont fortement colorés, le cytoplasme conserve une faible activité diffuse sans disposition spéciale.

— *Sinusoïdes.* — Ils ne révèlent jamais d'activité enzymatique et c'est là la grande différence avec la localisation hépatique de la Ph alcaline: on ne trouve en effet jamais de Ph acide dans leur lumière dans quelque zone que ce soit, et ceci est très nettement visible sur les foies présentant une légère congestion sinusoïdale : ils apparaissent ainsi comme des

sillons sinueux et clairs tranchant avec les travées cellulaires hépatiques qui les délimitent. (Photo 10.)

Par contre, les cellules de Kupffer montrent une activité nucléaire aussi forte que celle des noyaux hépatiques et sont de ce fait très facilement reconnaissables le long des parois des sinusoïdes; par ailleurs leur cytoplasme est le plus souvent riche en enzyme.

La veine centro-lobulaire ne montre jamais d'activité enzymatique.

— *Canalicules biliaires intracellulaires et intratrabéculaires.* Nous avons signalé l'activité cytoplasmique des C. H., parfois polarisée autour des canalicules intratrabéculaires et intracellulaires, mais ceux-ci ne contiennent jamais d'enzyme, leur lumière est vide quelle que soit l'activité des C. H. qui les limitent.

— *Espaces portes.* — A leur niveau les endothéliums des veines portes ne montrent aucune activité, seuls les noyaux endothéliaux sont colorés en noir et les lumières vasculaires sont toujours vides.

Il en est de même pour les artères hépatiques.

Les canaux biliaires ne montrent eux aussi aucune activité phosphatasique dans leur lumière, mais par contre les noyaux des cellules épithéliales qui les constituent présentent des colorations identiques à celles des noyaux des C. H. Leur cytoplasme peut parfois aussi contenir de grosses et nombreuses granulations enzymatiques, le plus souvent polarisées autour de la lumière centrale.

Le tissu conjonctif périportal jeune présente lui aussi au niveau des noyaux de ses fibroblastes une forte activité, mais les cytoplasmes sont le plus souvent vides.

Les fibrocytes du tissu conjonctif âgé conservent une activité enzymatique nucléaire intacte, mais leur cytoplasme est toujours vide d'enzyme.

Quant aux éléments sanguins des vaisseaux: les hématies sont dépourvues d'activité, par contre les noyaux des lymphocytes et des polynucléaires sont intensément colorés.

Nous n'avons pas trouvé de différences notables entre les foies adultes et infantiles.

— *En résumé,* il ressort nettement de cette description portant sur la topographie de la Ph acide des foies normaux :

— que l'activité enzymatique acide est une constante de tous les noyaux des différentes sortes de cellules constituant le tissu hépatique ;

— que les vaisseaux sanguins et les canaux biliaires ne contiennent pas d'enzyme;

— que le cytoplasme de la C. H. est bien plus riche en Ph acide qu'en Ph alcaline, celle-là paraissant être une constante cellulaire en relation avec le métabolisme interne propre de la cellule.

— Discussion.

Les travaux relatifs à la topographie des Ph acides du tissu hépatique sont rares.

Il faut cependant noter les premières descriptions sommaires de Gomori (1941) qui signale l'enzyme au niveau de la C. H. et de la cellule de Kupffer mais jamais dans les canalicules biliaires.

Wolf, Elvin, Kabat, Newman en 1943; Baker, Li, Evans, en 1948, donnent une description détaillée qui correspond presque point par point avec la nôtre.

Baud et Fullerinqer, en 1948, ont signalé la très forte activité acide de la membrane nucléaire de la C. H., ce que nous avons par ailleurs retrouvé, activité bien supérieure à celle de la Ph alcaline.

Enfin, nous sommes d'accord également avec Rabinovitch (1949) en ce qui concerne l'absence absolue de Ph acide des nucléoles mais sa présence dans la chromatine, les caryosomes et la chromatine associée aux nucléoles; et avec Rabinovitch et Andreucci (1949) sur la présence de l'enzyme au niveau des noyaux des lymphocytes et des polynucléaires sanguins.

Tous les auteurs sont d'accord (Noback 1949, Noback et Paff 1951), en ce qui concerne la présence chromatinienne de la Ph

acide des fibroblastes et la présence plus inconstante de l'enzyme au niveau de leur cytoplasme.

Enfin, les travaux chimiques de Palade (1951), confirment la particulière richesse du cytoplasme de la C. H., puisque cet auteur note que le cytoplasme contient 90 % de l'enzyme, le noyau seulement 4 à 5 %. L'enzyme cytoplasmique serait localisé dans les mitochondries.

Le peu d'abondance de travaux relatifs à la topographie des Ph acides du tissu hépatique est très compréhensible : si en effet, il est assez facile d'exécuter quelques colorations, la réaction malgré toutes les précautions prises, est tellement capricieuse que lorsqu'on l'applique en série on se trouve aux prises avec de multiples difficultés comme le signalent tous les auteurs qui se sont occupés de cette question. (Rabinovitch et Andreucci entre autres).

Nous avons résumé dans le tableau n° 2 ci-joint les topographies de la Ph acide du foie humain normal ; il ne représente évidemment qu'une moyenne portant non sur de nouvelles activités, mais sur des variations minimes des degrés d'activité.

— Conclusions.

De la détection histochimique de la Ph acide du foie humain normal, nous pouvons conclure :

1° Que l'activité phosphatasique acide du foie humain est bien supérieure à l'activité phosphatasique alcaline, tout en étant inférieure à celle d'autres organes (prostate) ;

2° Que cette activité révèle une topographie identique pour tous les foies adultes et infantiles avec de très légères variations portant non sur de nouvelles localisations mais sur des degrés d'activité ;

3° Qu'il n'y a pas de divergence dans les topographies décrites par les rares auteurs qui se sont occupés de la question ;

4° Que les détections enzymatiques des deux enzymes, acide et alcaline, sont bien spécifiques ainsi que

le prouvent les topographies comparées de ces enzymes schématisées dans le tableau n° 2.

### b) Foies pathologiques

Nous avons effectué les réactions de la Ph acide sur les mêmes prélèvements ayant servi pour la détection de la Ph alcaline.

Le temps optimum d'incubation choisi fut toujours de 16 h.

1. La Ph acide dans les lésions élémentaires de la C. H.

*Surcharges.* — La C. H. stéatosique conserve intégralement son activité enzymatique nucléaire, son cytoplasme a par ailleurs une activité variable mais l'enzyme ne semble pas en relation directe avec la charge graisseuse, en effet les granulations enzymatiques se trouvent le plus souvent dans la partie de la cellule opposée à celle où se trouvent les granules graisseux.

Quand la cellule stéatosique n'est plus qu'une énorme vésicule, l'enzyme est encore présent dans le mince ruban cytoplasmique persistant, avec une activité plus grande localisée autour du noyau qu'elle peut souvent masquer.

— La C. H. en surcharge glycogénique montre une activité nucléaire normale, mais le cytoplasme semble plus pauvre que normalement car l'enzyme est limité aux minces prolongements cytoplasmiques qui délimitent les vacuoles glycogéniques.

— La surcharge pigmentaire paraît sans rapport avec la Ph acide, bien que celle-ci soit parfois présente au niveau des pigments biliaires.

*Dégénérescence et nécrose.* — Dans les dégénérescences, le cytoplasme est le premier à voir disparaître son activité qui diminue graduellement tandis que le noyau semble intact.

Dans la pycnose, tout comme pour la Ph alcaline, le noyau paraît plus riche en enzyme dans un premier stade; il se colore alors intensément d'une façon homogène, si bien qu'on ne peut plus y déceler de structure; puis, peu à peu son activité nucléaire diminue et s'efface.

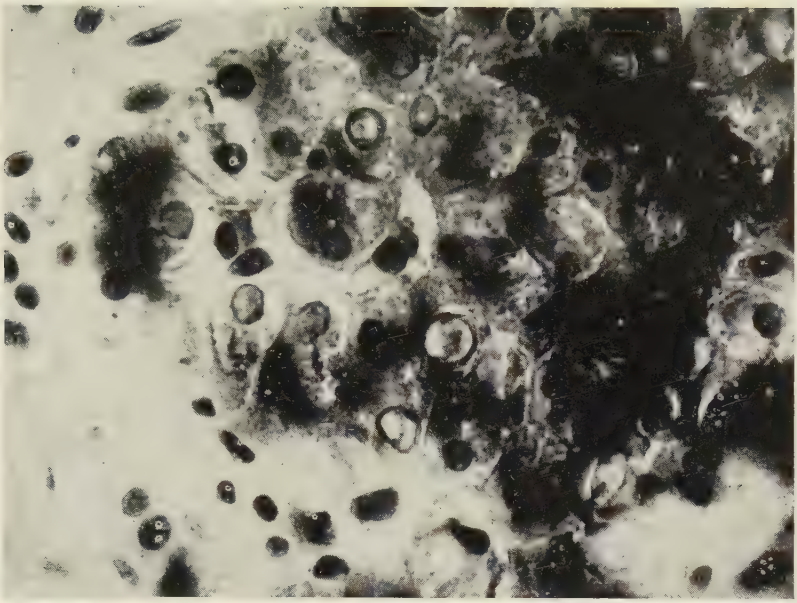


**PHOTO 11. — Nucléoles vacuolaires. Phosphatase acide** (incubation 16 h.)
Les deux membranes chromatiniennes concentriques de ces formations montrent une intense activité enzymatique. Noter les activités cytoplasmiques et nucléaires hépatiques de degrés différents.

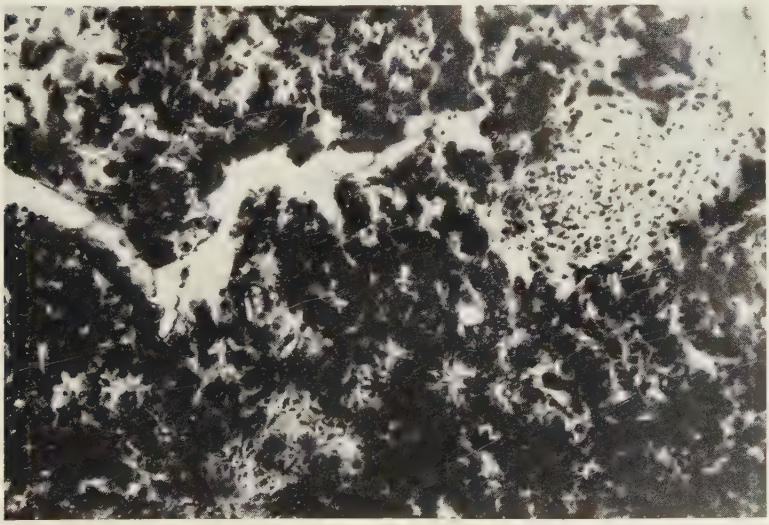


**PHOTO 12. — Hépatite épidémique. Phosphatase acide** (incubation 16 h.)
Richesse globale cellulaire augmentée. A droite îlot clair de cellules en nécrose et d'infiltrats cellulaires avec activité enzymatique uniquement nucléaire.

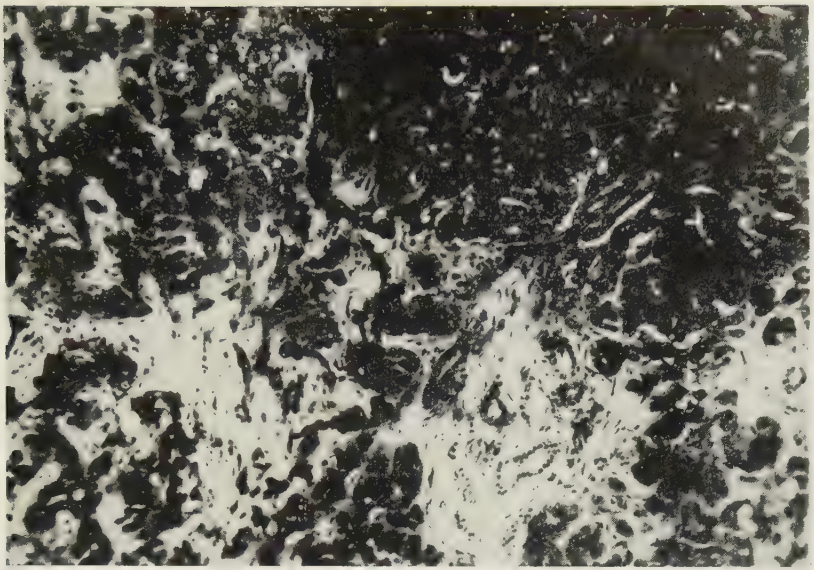


**PHOTO 13. — Cirrhose avec forte activité enzymatique.**
**Phosphatase acide** (incubation 16 heures)

Noter l'aspect clair des bandes fibreuses dans lesquelles on ne peut distinguer que les noyaux fibrocytiques, et les noyaux des épithéliums des néocanalicules biliaires.

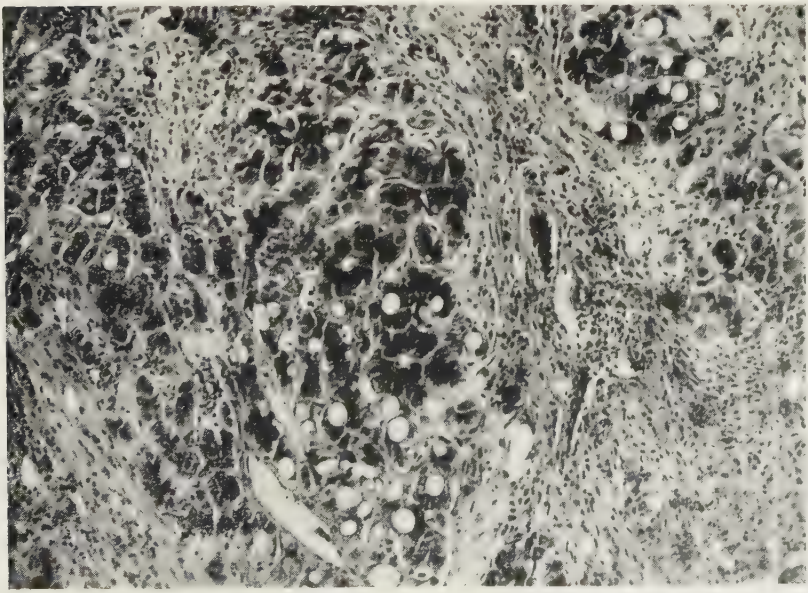


**PHOTO 14. — Cirrhose annulaire avec remaniements important et stéatose.**
**Phosphatase acide** (incubation 16 heures)

Les cellules hépatiques enserrées par le tissu fibreux conservent une activité enzymatique normale limitée à un croissant cytoplasmique dans les cellules graisseuses. Vacuité enzymatique vasculaire absolue.

Dans les noyaux en caryolyse les images observées sont identiques à celles données par la Ph alcaline.

*Anomalies nucléolaires* (1). — Dans les petites anomalies nucléolaires l'activité enzymatique est toujours nulle.

Dans les nucléoles vacuolaires, le premier stade ribonucléique est difficile à saisir à cause de l'absence de Ph acide au niveau des ribonucléoprotéines; le deuxième stade se présente sous forme d'une vacuole centrale vide de toute activité enzymatique, même quand elle contient du glycogène, finement délimitée par un anneau chromatinien riche en enzyme acide. (Photo 11.)

### 2. La Ph acide dans les foies pathologiques

Nous suivrons le même plan que précédemment :

a) *Hépatite épidémique.*

Ce qui frappe à première vue est la richesse enzymatique des C. H. qui se révèlent par une intensité particulière de la coloration noire, mais point important, cette hyper-activité n'atteint électivement que les C. H. saines. (Photo 12).

— *Cellules hépatiques.* — La cellule noble, morphologiquement intacte, révèle une inhabituelle activité protoplasmique pouvant aboutir à l'obscurcissement total de tout détail cellulaire noyé dans une flaque noire.

Cette activité protoplasmique est le plus souvent diffuse et bien rarement sous forme de granulations.

Les noyaux cellulaires présentent une activité normale ou supérieure au niveau de leur membrane et de leur chromatine sans que les nucléoles ne présentent jamais de réaction positive.

Les C. H. dégénérées ou en nécrose, prédominant dans la zone centro-lobulaire, ne présentent que peu ou pas d'activité, si bien qu'on ne peut les différencier des cellules d'infiltration que par la forme plus régulière de leur noyau.

(1) Les anomalies nucléolaires de la cellule hépatique humaine seront longuement décrites dans le paragraphe correspondant du chapitre 2 concernant l'histochimie de nucléoprotéines et acides nucléiques hépatiques.

— *Canalicules biliaires, sinusoïdes, espaces portes.* — Ces éléments ne diffèrent en rien de ceux d'un foie normal et se caractérisent par l'absence d'activité; cependant ils ressortent ici davantage sur le fond plus foncé de la préparation et sont de ce fait plus facilement identifiables.

Les mastocytes, lorsqu'ils sont présents révèlent une activité nucléaire et cytoplasmique localisée à leurs granulations métachromatiques.

— *Conclusions.* — L'hépatite épidémique est donc caractérisée exclusivement par une augmentation de l'activité phosphatasique acide à l'intérieur du cytoplasme de la C. H.

b) *Hépatite tuberculeuse: miliaire.*

L'aspect général des coupes est identique à celui de l'hépatite épidémique avec peut-être une activité enzymatique un peu inférieure mais toujours supérieure à la normale.

— L'aspect du *follicule de Kôster* est tout à fait semblable à celui obtenu dans les détections de la Ph alcaline : la cellule géante de Langhans est difficilement repérable car elle ne présente pas d'enzyme cytoplasmique, seules les chromatines nucléaires sont légèrement teintées et visibles uniquement à l'immersion. Le tissu de granulation du follicule tuberculeux se présente sous forme d'un fin piqueté nucléaire sans aucun détail cytoplasmique.

Nous n'avons pas eu l'occasion d'observer de tubercule et nous ne savons, de ce fait, si l'enzyme est présent au niveau du caséum et son rôle possible dans la précipitation du phosphate de calcium.

— *Conclusions.* — L'image du follicule de Kôster est comparable à celle donnée par la Ph alcaline. Le parenchyme hépatique présente une augmentation globale de son activité.

c) *Ictère par rétention et stase biliaire.*

Il n'y a pas de différences notables avec la topographie enzymatique normale.

— Signalons que *les C. H.* contenant des pigments biliaires

présentent une concentration enzymatique le plus souvent forte au niveau de leurs cytoplasmes.

Les pigments biliaires révèlent une légère activité, ainsi que les thrombi, si bien que les C. H. en dégénérescence dont le protoplasme est imbibé de pigments se révèlent par une activité enzymatique granulaire.

— *Les canalicules biliaires* ne contiennent jamais d'enzyme quelle que soit leur localisation, même dans la zone où la stase est la plus accusée. Ils sont cependant visibles parce que les cytoplasmes des C. H. qui les délimitent dessinent leur lumière. Seuls les pigments et thrombi qu'ils peuvent contenir révèlent une activité enzymatique.

— Les *sinusoïdes* ne révèlent aucune activité phosphatasique. Notons cependant la forte concentration nucléaire enzymatique des cellules de Kupffer. Quand ces cellules contiennent du pigment, celui-ci est toujours coloré.

Les espaces portes sont normaux.

— *Conclusions.* — Variabilité de l'activité enzymatique de la C. H. sans relation avec sa charge pigmentaire. Présence d'enzyme au niveau des pigments biliaires.

d) *Cirrhoses.*

L'aspect général des prélèvements de foies cirrhotiques est tout à fait caractéristique : les îlots de parenchyme colorés en noir sont ceinturés par des bandes fibreuses très éosinophiles et dans lesquelles on ne distingue que les noyaux cellulaires. (Photo 13.)

— *Cellules hépatiques.* — Elles présentent des activités diverses : hyper et hypo-activité se voient dans des cellules situées côte à côte. Cette hyperactivité atteint le cytoplasme (et peut souvent obscurcir tous les détails cellulaires) et le noyau, sans jamais égaler cependant l'hyperactivité observée dans l'hépatite épidémique. D'autres cellules, par ailleurs tout à fait normales, ne présentent qu'un anneau ou un petit granule enzymatique péri ou paranucléaire, ou bien l'activité phosphatasique

est diffuse, mais peu intense et se révèle par une coloration brun-noir.

On trouve aussi des noyaux présentant des intensités diverses sans rapport avec la charge enzymatique cytoplasmique.

Les cellules stéatosiques présentent des intensités variables comme nous l'avons déjà décrit.

— *Canalicules biliaires, sinusoïdes, espaces portes.* — La veine centrale, les sinusoïdes et les vaisseaux sanguins portaux ne sont jamais colorés.

On note cependant une positivité des noyaux des cellules de Kupffer, des cellules endothéliales artérielles ou veineuses et des cellules épithéliales constituant les néo-canalicules biliaires. Ceux-ci ressortent très nettement sur les îlots fibreux qui les entourent. (Photo 14.)

Les fibrocytes n'ont qu'une activité nucléaire, les fibroblastes pouvant parfois présenter en outre une légère activité cytoplasmique.

Les canalicules biliaires ne sont jamais colorés.

— *Conclusions.* — Les cirrhoses sont caractérisées par une activité enzymatique très variable au niveau des C. H. exclusivement.

e) *Epithéliomas.*

Nous avons également recherché la Ph acide sur les deux variétés d'épithélioma sus-mentionnés.

L'aspect général est identique aux foies normaux quant à la richesse enzymatique.

Notons cependant la forte activité nucléaire et cytoplasmique des cellules hépatiques épithéliomateuses dans la variété trabéculaire, tandis que celles de la variété acineuse semblaient être moins riches en enzyme protoplasmique.

Vaisseaux, sinusoïdes, canalicules, sont tout à fait normaux quant à leur activité acide.

### 3. Discussion

Il y a bien peu de travaux relatifs à cette question, aussi la discussion sera brève.

— Les rapides descriptions de Wolf, Elvin, Kabat et Newman (1943) mentionnent, comme nous l'avons vu, une diminution, précédant la disparition, de la Ph acide cytoplasmique et nucléaire des C. H. en dégénérescence.

— La présence de cet enzyme au niveau des granulations métachromatiques des mastocytes avait été signalée par Noback (1946), Noback et Montagna (1946), Paff et coll. (1947), Ribey et coll. (1949)...

— Gomori (1943) mentionne que le tissu de granulation tuberculeux du lapin ne présente de la Ph acide que dans les noyaux des cellules d'infiltration. Il la signale cependant dans le caseum jeune, et elle proviendrait, pense-t-il, du sang (?), car le vieux caseum n'en contient plus. Pour Prina (1951), le caseum ne contient jamais de Ph acide.

### 4. Conclusions

Les résultats obtenus par la détection histochimique de la phosphatase acide des foies humains pathologiques nous prouvent, une fois de plus, qu'un dosage semi-quantitatif des enzymes est possible si l'on obéit à une technique précise et à des critères bien établis.

Des résultats énoncés plus haut nous pouvons conclure que dans les différentes affections hépatiques étudiées :

— hépatites,
— cirrhoses,
— stase biliaire,
— épithéliomas,

les variations de l'activité phosphatasique acide portent exclusivement sur la C. H., ces variations peuvent être en plus ou en moins.

Nous avons résumé les différentes topographies décrites dans le tableau n° 2. La comparaison des diverses localisations des deux enzymes, alcaline et acide, prouve que les détections enzymatiques sont bien spécifiques et que les activités décelées répondent à deux enzymes différents.

Evidemment l'aide apportée à l'histopathologiste dans ses diagnostics par la détection de cet enzyme est nulle ou presque ; nous pensons que *cette étude méritait cependant d'être tentée pour préciser quelques points de cytochimie enzymatique.*

Mais surtout ces recherches ont eu le mérite de prouver la *localisation exclusivement intracellulaire de cet enzyme, topographie qui pose des problèmes histophysiologiques.* Nous avons en effet montré que l'on ne trouve jamais la Ph acide à l'intérieur des lumières vasculaires et il semble donc que cette diastase soit un enzyme de « constitution » qui ne participe qu'au métabolisme interne de la cellule hépatique, puisqu'elle n'est jamais excrétée dans le sang et les conduits biliaires, comme l'est la Ph alcaline qui rentre *pro parte* dans le groupe des enzymes de « fonctionnement ».

## E) CONCLUSIONS

Au terme de cette étude topochimique, que nous avons voulue aussi complète que possible, portant sur les glycérophosphatases acide et alcaline du foie humain, il est nécessaire de dégager les traits essentiels permettant une vue d'ensemble synthétique claire et précise des Ph sous les différents points de vue que nous avons successivement examinés.

1. *Concernant le problème technique histochimique.* — Les méthodes proposées sont très acceptables si elles répondent aux critères histochimiques les plus exigeants. Il suffira dans l'application de tenir compte surtout de la fixation et du temps d'incubation optimum, qui doit être fixé empiriquement, mais qu'il faudra toujours maintenir pour avoir des résultats comparables.

2. *Concernant la localisation histochimique des Ph alcaline et acide du foie normal.* — La richesse du foie en ces deux enzymes est bien différente. Il contient les deux Ph au niveau des noyaux de la C. H. et de la cellule de Kupffer, peu d'enzyme alcaline et beaucoup d'enzyme acide dans les cytoplasmes hépatiques.

Les vaisseaux sanguins et biliaires ne contiennent que la Ph alcaline.

3. *Concernant l'aide diagnostique apportée à l'histologiste par ces détections enzymatiques.* — Cette aide est faible. Cependant la détection de la Ph alcaline peut orienter un diagnostic hésitant d'ictère par rétention.

Aussi recommandons-nous l'application de la technique alcaline dans cette circonstance.

4. *Concernant l'histophysiologie hépatique.* — Comme nous le verrons par la suite les interprétations physiologiques de ces diverses topographies enzymatiques sont très importantes, mais d'ores et déjà nous pouvons distinguer deux sortes de Ph suivant les rôles qui leur sont dévolus.

— Celles qui interviennent dans le métabolisme intermédiaire interne de la cellule et qui sont des constantes cellulaires ou tissulaires;

— Celles auxquelles sont dévolues un rôle spécialisé.

— Le premier groupe comprend les Ph de « *constitution* ». Ce sont celles que l'on détecte au niveau de la chromatine et de la membrane nucléaire, c'est-à-dire les deux enzymes acide et alcaline et la Ph alcaline nucléolaire; elles comprennent par ailleurs très probablement la Ph acide des cytoplasmes des cellules hépatiques.

Ces enzymes de constitution sont révélés dans les cultures de tissu dont les cellules sont isolées de toute corrélation organique; et elles ne sont pas influencées par des facteurs de régulation externe.

— Le deuxième groupe comprend les Ph de « *fonctionnement* », dont les rôles et les localisations sont spécifiques.

Elles agissent sur un substrat spécifique, le plus souvent, et sont localisées dans les parties hautement fonctionnelles de tel ou tel organe.

— C'est le cas de la Ph alcaline des cellules à plateau strié de l'intestin grêle, des tubes contournés rénaux et des canalicules biliaires...

— C'est aussi le cas de toutes les Ph spécifiques.

Toutes ces Ph sont contrôlées et réglées dans leur activité par d'autres substances fonctionnelles et par des modifications des facteurs nutritifs.

La signification physiologique de ces deux groupes d'enzyme est donc fort différente.

CHAPITRE II

# Histochimie des nucléo-protéines et acides nucléiques hépatiques

## A) INTERET DE CETTE ETUDE

Ayant longtemps intéressé les seuls histologistes, le problème des nucléoprotéines (N. P.) et des acides nucléiques (A. N.) ne cesse d'éveiller un intérêt croissant parmi tous les biologistes; à l'heure actuelle les biochimistes, immunologistes, microbiologistes, cytologistes, embryologistes s'intéressent à cette question car « depuis la cellule hautement différenciée des êtres supérieurs jusqu'à la cellule dégradée que représente vraisemblablement les virus, tous les êtres vivants contiennent des A. N. qui apparaissent dès lors comme des substances essentielles à la vie ».

Depuis 1869, date à laquelle Miescher isola des pyocytes une substance qu'il appela « nucléine », la question des A. N. a énormément progressé; des travaux de plus en plus nombreux concernant leurs propriétés physiques, leur composition chimique, leur localisation intracellulaire et leur rôle éventuel dans la cellule, leur sont consacrés chaque année.

L'emploi récent de techniques histophysiques d'une part, la découverte de nouvelles réactions nucléales et plasmales d'autre part, ont permis, au point de vue cytologique, d'approfondir singulièrement ce problème.

Il nous a paru intéressant, *pour de nombreuses raisons,* d'étudier spécialement le comportement de ces constituants au niveau du foie humain.

— Dans ces vingt dernières années, *le rôle des N. P. dans le métabolisme protidique* a été le sujet de multiples travaux bio et histochimiques. De ces études, il ressort que toutes les cellules exigeant une forte synthèse de protéines cytoplasmiques (tissus en voie de croissance, bactéries, cellules néoplasiques, cellules embryonnaires et cellules sécrétrices...) sont toujours caractérisées par une haute concentration d'acide ribonucléique dans leur cytoplasme (se traduisant histochimiquement par une basophilie) ; aussi semble-t-il se dégager de cette notion que la présence d'acide ribonucléique a une grande importance dans la synthèse des protéines cellulaires.

Or, la position qu'occupe le foie dans le métabolisme des protides est primordiale, comme l'ont démontré d'une part des investigations chimiques sur le métabolisme protéique, d'autre part des investigations histophysiologiques sur des animaux soumis à des régimes alimentaires variés, travaux qui ont prouvé le rôle fondamental, sinon exclusif, que joue le foie dans la fabrication des protides sanguins (fibrinogène, albumines, globulines).

— Par ailleurs, de très nombreuses publications histochimiques et cytochimiques ont montré que parmi les organites cellulaires, *les nucléoles, les mitochondries et surtout les microsomes,* sont particulièrement riches en acide ribonucléique. Or, le rôle dévolu à ces organites nucléaires et cytoplasmiques constants, s'il est mal connu, n'est plus à démontrer.

Donc, la présence et la distribution de la basophilie cytoplasmique et nucléolaire des cellules hépatiques (C. H.) reflet de la synthèse protéique, peut offrir un critère histologique de l'état fonctionnel du foie ou du moins quelques aspects de celui-ci.

— Il était enfin permis de supposer que la présence et la distribution de ce matériel basophile pourrait aider l'anatomo-pathologiste dans le *diagnostic histologique et le pronostic* de certaines affections hépatiques.

*Conclusions.* — C'est en bref un *triple intérêt*, histomorphologique, histochimique et histophysiologique, qui nous incita à entreprendre cette étude.

## B) APERÇU BIOCHIMIQUE SUR LES N. P. ET LES A. N.

Ce serait sortir du cadre de ce travail que de faire un exposé des connaissances chimiques actuelles concernant les N. P.; nous ne voulons simplement que brosser un rapide tableau de la question, et rappeler les notions indispensables à la compréhension des techniques histochimiques, du rôle et du métabolisme des N. P. de la C. H.

— CONSTITUTION CHIMIQUE DES N. P. — Les N. P. font partie des protides et plus spécialement de la catégorie des hétéroprotéides; elles s'opposent donc aux holoprotéides.

Elles sont constituées schématiquement par l'union d'une protéine et d'un groupement prosthétique non protidique: l'A. N.; celui-ci ainsi dénommé car il fut découvert à l'origine en proportion considérable à l'intérieur des noyaux cellulaires.

Des deux constituants des N. P., c'est l'A. N. qui est le plus étudié et le mieux connu.

1. *Les A. N.* présentent une architecture générale invariable et stéréotypée. On admet actuellement que ce sont des polynucléotides unissant en bloc plusieurs nucléotides dont chacun représente l'unité fondamentale de l'A. N.

Ceux-ci sont composés :

— d'une molécule d'acide orthophosphorique;

— d'une molécule de pentose;

— d'une molécule de base hétérocyclique.

Selon la nature du pentose on peut distinguer deux sortes d'A. N.:

—l'acide ribose nucléique = ribonucléique = pentose nucléique = zymonucléique (A. R. N.) dont le pentose est le d ribose;

— l'acide désoxyribonucléique = desribonucléique = désoxypentose nucléique = thymonucléique (A. D. N.) dont le pentose est le désoxyribose = thyminose = ribodésose = désribose (Levène, Mikeska et Mori, 1930).

Ces deux A. N. diffèrent également par la nature de leur base hétérocyclique, celle-ci pouvant être :

— purique: adénine, guanine;

— pyrimidique: cytosine, uracile, thymine, 5 méthyl-cytosine.

Aussi, distingue-t-on des mononucléotides d'un même type selon la nature de la base: acide adénilique, uracilique...

Le mode d'union des nucléotides entr'eux est mal connu; on admet généralement l'opinion de Levène faisant intervenir une liaison de type ester entre le PO4H3 d'un nucléotide et une fonction alcool de l'ose de l'autre. En outre, on admet que les bases puriques et pyrimidiques alternent d'un mononucléotide à l'autre.

On a cru longtemps avec Levène que les A. N. étaient formés par un assemblage complexe de tétranucléotides, mais on a tendance actuellement à considérer avec Wiatt, Gulland et Astbury qu'il s'agit de polyoctonucléotides.

Si on ajoute à ceci, d'après Boivin et Chargaff, que chaque espèce animale possède un et peut-être un grand nombre d'A. R. N. et d'A. D. N., et que par ailleurs les A. N. ne sont pas des substances inertes au sein de la cellule mais qu'ils subissent constamment des remaniements, on pourra juger de la complexité de la question.

2. *Les molécules protidiques* sont peu connues. On sait qu'il s'agit d'une protéine basique (protamine ou histone) pour les

desoxyribonucléoprotéines (D. N. P.), d'une protéine banale pour les ribonucléoprotéines (R. N. P.) (albumine ou globuline).

Quant à la nature de l'union entre l'A. N. et la protéine, elle est mystérieuse: on pense que si la polymérisation de polynucléotides se produit par une deuxième liaison ester de chaque acide phosphorique avec le sucre de l'autre nucléotide, ceci laisse libre un groupement acide pour chaque radical phosphorique, assez fort pour pouvoir facilement fixer les groupes chargés positivement de protéines. On pense donc que l'A. N. est ainsi combiné avec les groupes basiques des diaminoacides des protéines (arginine, histidine, lysine), en donnant des nucléates de protéine ou nucléoprotéines.

*En résumé,* on rencontre dans la cellule deux grands types de N. P.: les R. N. P. à ribose et les D. N. P. à ribodésose.

— REPARTITION. — C'est aux travaux de Caspersson et son école, et de Brachet, que nous devons l'essentiel de nos connaissances concernant les distributions intra-cellulaires des N. P.

Les résultats obtenus par ces deux auteurs concordent parfaitement, quoiqu'ils aient été obtenus indépendamment et par des techniques de principe entièrement différent.

*L'A. R. N. est un constituant du nucléole et du cytoplasme, à l'inverse de l'A. D. N. qui ne se rencontre que dans la chromatine.* Il semble bien que la chromatine, ou plutôt une certaine partie de celle-ci, puisse contenir une faible proportion d'A. R. N. comme l'ont confirmé les dosages d'A. N. des deux types qu'a exécutés Brachet sur des noyaux isolés. Cette portion de la chromatine correspond à l'hétérochromatine de Heitz; il y a donc une certaine parenté chimique entre l'hétérochromatine et le nucléole.

— METABOLISME. — Il se fait évidemment dans deux sens opposés, synthèse ou dégradation :

— *Le catabolisme endogène* des N. P. est assez bien connu, il s'effectue sous l'action d'enzymes très variés: nucléases,

nucléotidases, nucléosidases, purine-désaminase..., qui ont pour but de les scinder en composés de plus en plus simples jusqu'aux constituants ultimes :

— les bases pyrimidiques qui seront oxydées totalement en urée;

— les bases puriques qui se transformeront en acide urique;

— les oses qui rentrent dans le cycle glucidique;

— l'acide orthophosphorique.

*Le catabolisme exogène* se réalise grâce à une série d'enzymes libérés dans la lumière intestinale.

— *L'anabolisme et la synthèse* des N. P. est obscure et purement hypothétique :

— les pentoses proviennent probablement du glucose par l'intermédiaire de l'acide glycuronique;

— les bases puriques, de corps en $C_3$ ou possédant un noyau imidazole (histidine) ou guanidique (arginine);

— les bases pyrimidiques sont d'origine inconnue;

— le PO4H3 du P minéral ou de phosphates, métabolites intermédiaires banaux;

— quant au mode de formation de la copule protidique il entre dans le problème général de la synthèse des protéines qui constitue un problème biologique à résoudre.

— CONCLUSIONS. — Nous pouvons conclure avec Barry:

1° Contrairement à une opinion longtemps classique, *les A. N. sont simultanément présents dans toute cellule, animale et végétale* (Delaporte, 1939; Brachet, 1940), et sont combinés à des protéines basiques;

2° *Les chromosomes seuls renferment de l'A. D. N.*, le cytoplasme n'en contient jamais;

3° *L'A. R. N. existe dans l'hétérochromatine et les nucléoles, dans le cytoplasme* à l'état concrétisé ou diffus.

## C) TECHNIQUES DE DETECTION HISTOCHIMIQUE DES N. P. ET A. N.

La détection des N. P. peut s'effectuer de deux manières :

— soit par des méthodes histophysiques ;

— soit par des méthodes histochimiques.

Les méthodes histophysiques, introduites en 1935 par Caspersson et son école, se sont montrées d'une fécondité extraordinaire. Elles sont basées sur la propriété que présentent les pyrimidines et les purines d'absorber fortement l'U. V. avec un maximum aux environs de 2.650 A°. Par l'emploi d'une technique délicate et coûteuse, Caspersson est parvenu à mesurer le spectre d'absorption dans l'U. V. des différents organites cellulaires. Cependant cette méthode ne permet pas de distinguer l'un de l'autre les deux types d'A. N. Elle demande par ailleurs, un matériel si spécial qu'elle n'est pas accessible à tous les laboratoires malgré les résultats importants qu'elle peut fournir.

Aussi, nous sommes-nous contenté des méthodes histochimiques qui se sont singulièrement perfectionnées et enrichies au cours de la dernière décade.

### A. — Méthodes histochimiques proposées

Elles sont très nombreuses; on peut en gros distinguer trois groupes de méthodes:

— Les méthodes de détection des oses constitutifs des A. N. Ces recherches ne s'effectuant qu'après hydrolyse préalable des N. P. On peut ainsi détecter :

— le ribose;

— le désoxyribose;

— les deux oses à la fois.

— Les méthodes basées sur la propriété basophile des N. P. en connexion avec les tests enzymatiques et chimiques.

— Les méthodes détectant les divers constituants chimiques des N. P. (oses exceptés).

## I. Détection des oses.

a) *Réaction nucléale de Feulgen-Rossenbeck* (1924) :

Elle est spécifique pour le désoxyribose, elle n'est donc donnée que par l'A. D. N. après hydrolyse partielle.

Elle est basée sur le fait qu'une hydrolyse légère de l'A. D. N. élimine les bases hétérocycliques et démasque le désoxypentose qui recolore la fuchsine basique décolorée par SO2 (réactif de Schiff), d'où coloration du matériel nucléaire en rouge pourpre.

L'interprétation usuelle est que l'A. D. N. est partiellement hydrolysé par l'acide chlorhydrique en démasquant les groupements glucidiques réducteurs du thyminose restant aux endroits de production et produisant une coloration avec SO2; ce sucre, bien que ne possédant pas la structure d'un aldéhyde présente les propriétés réductrices de celui-ci. On explique ainsi le mécanisme de la réaction: l'acide rompt d'abord les liaisons entre le sucre et les nucléotides voisins, puis entre le sucre et la base ce qui démasque le désoxyribose, lequel se transforme en forme furanose qui prend la forme aldéhydique et se combine au réactif de Schiff en donnant un composé insoluble responsable de la coloration, que Stacey identifie à l'omegahydroxyaldéhydelévulinique.

Mais Stedman et Stedman ont proposé une interprétation totalement différente; pour eux le composé produit par l'interréaction de l'A. D. N. et du réactif de Schiff est soluble dans l'eau et avidement absorbé par la protéine du noyau cellulaire (chromosomine), quoique le composé ne se produise qu'en présence d'A. D. N. les structures colorées correspondraient aux protéines, et non à l'A. D. N. qui est détruit par l'hydrolyse. Cette interprétation fut critiquée: si, en effet, l'A. D. N. pur est fixé au Zenker, enrobé dans la paraffine et coupé, il donne une forte réaction de Feulgen.

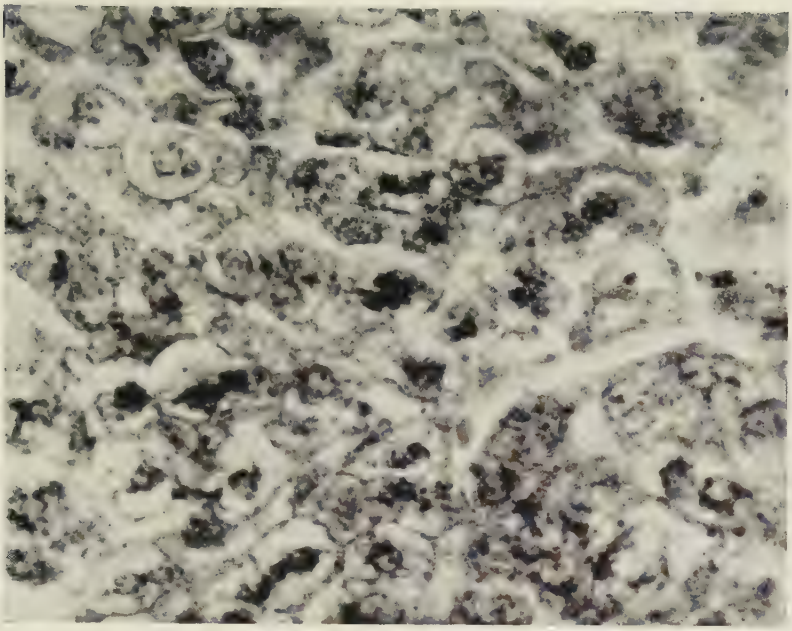


**PHOTO 15. — Foie normal : Aspect général**

Les cellules centrolobulaires (à droite) sont plus basophiles que les cellules périportales (en haut et à gauche), mais toutes contiennent des blocs de Berg de topographie intracytoplasmique et de morphologie variables (Giemsa acétique).

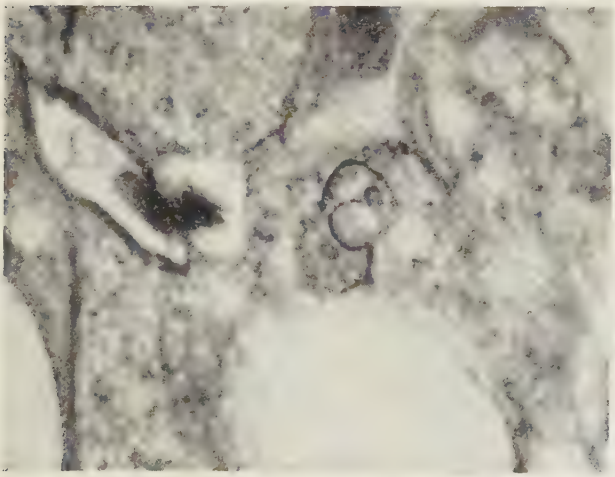


**PHOTO 16. — Nucléole vacuolaire au stade 2, déversant son contenu dans le cytoplasme.**

Les 2 becs du pertuis n'ont pas la même netteté car ils sont dans des plans différents. Ce même noyau contient en outre 2 nucléoles vacuolaires au premier stade (hématéine-éosine).

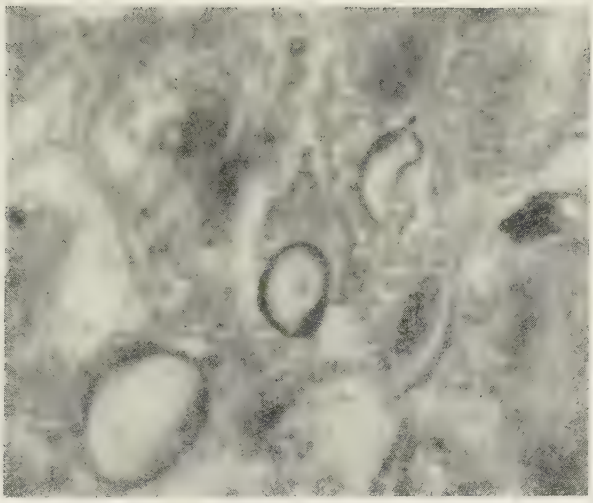


**PHOTO 17. — Nucléole vacuolaire au stade 2**

Figure centrale en croissant que nous interprétons comme une vidange du contenu vacuolaire à travers la membrane intacte ; le liquide excrété constitue un petit anneau clair intracytoplasmique refoulant la vésicule nucléaire qui s'invagine. A gauche deux autres énormes vésicules au stade 2 (hématéine-éosine).

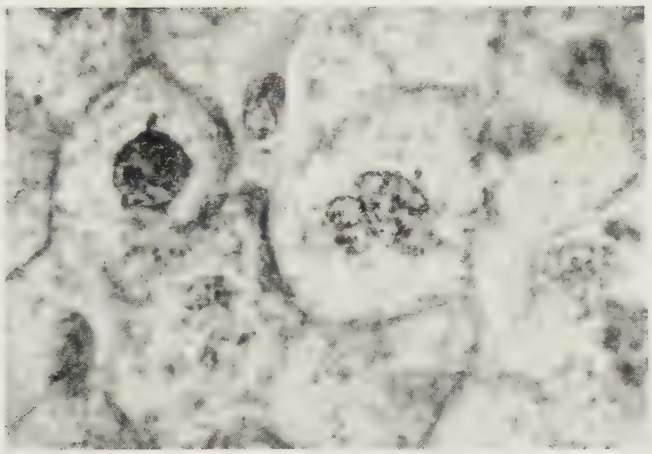


**PHOTO 18. — Aboutissement d'une pseudomitose pluripolaire par pseudométaphase stathmocinétique**

Cellule trinucléée (au centre) à deux micronoyaux et un macronoyau. Ces noyaux n'étant pas sur le même plan, il était difficile d'avoir une photo nette. Intoxication phalloïdienne (hématéine-éosine).

Cette réaction semble un test microchimique de l'A. D. N., non parce que la recoloration du réactif de Schiff ne pourrait s'obtenir par d'autres substances (il en existe en fait de nombreuses), mais parce qu'une réaction de Feulgen correcte ne peut donner de résultat positif après hydrolyse que s'il existe de l'A. D. N. En fait, on doit toujours colorer deux lames dont une témoin sans hydrolyse.

En conclusion, la réaction de Feulgen est un test spécifique du désoxyribose, c'est-à-dire des D. N. P. que celles-ci soient polymérisées ou dépolymérisées.

b) *Réactions nucléale et plasmale de Turchini, Castel et Khau Van Kien* (1943) (1) :

De découverte récente, ces réactions sont basées sur le même principe, mais ont le grand avantage de détecter les deux A. N., libérés après hydrolyse, par une teinte différente.

Le ribose et le désoxyribose des A. N., libérés par l'hydrolyse acide en milieu alcoolique, sont mis en évidence après condensation avec les *fluorones* par une réaction colorée spécifique.

Selon le degré de l'hydrolyse, on peut mettre en liberté successivement l'A. R. N. et l'A. D. N.; on peut ainsi distinguer plusieurs réactions:

— Réaction cytoplasmale: mise en évidence de l'A.R.N.;

— Réaction nucléale: mise en évidence de l'A. D. N.;

— Réaction optimale: mise en évidence des deux acides.

On peut différencier les A. R. N. des nucléotides par des réactions nucléotidiques après action de la ribonucléase ou des sels biliaires suivie de la réaction cytoplasmale.

Les temps d'hydrolyse varient avec les fixateurs, les résultats optimums s'obtiennent avec le Helly et le Navaschine.

(1) Nous remercions notre ami Khau Van Kien de nous avoir procuré ces renseignements théoriques et pratiques, et d'avoir exécuté pour nous quelques-unes de ces réactions.

Les résultats sont très démonstratifs et les structures très délicatement décelées :

— les structures à ribose en rouge ou rouge-orangé;

— les structures à désoxyribose en bleu ou bleu-violacé.

Ces techniques ont été critiquées par certains auteurs (Brachet, Boivin), à tort semble-t-il, car elles reposent sur des bases chimiques solides.

### 2. Méthodes basées sur les propriétés basophiles des N. P. en connexion avec les tests enzymatiques et chimiques.

— Les A. N. et les protéines sont des macro-molécules qui précipitent ou coagulent avec presque tous les liquides fixateurs et qui de ce fait ne risquent pas d'être entraînés au cours des processus intermédiaires de lavage, de déshydratation, d'inclusion et de montage. En fait les A. N. sont toujours liés aux protéines, et plus précisément avec le groupe basique des diaminoacides, pour former des nucléates de protéines. En raison du caractère fixe des A. N., *la détection des N. P. peut se ramener à celle des A. N. spécifiques constitutifs.* En fait, dans les préparations de tissus animaux, il n'y a finalement dans les cellules fixées que des protéines et des A. N., aussi, le concept conventionnel d'un type quelconque de cellules élaboré à partir de coupes ainsi préparées est essentiellement l'image de la distribution des N. P., par conséquent les réactions de coloration doivent être considérées surtout comme une interréaction physique ou chimique des colorants avec les N. P.

— *Les A. N. sont seuls basophiles,* mais conservent cette propriété même lorsqu'ils sont unis aux protéines. C'est le radical phosphorique des deux A. N. qui est responsable de cette basophilie. D'où l'on peut déduire *a priori* que tous les colorants basiques peuvent servir à caractériser les N. P.; il est actuellement évident que « la basophilie marque presque toujours la présence d'un A. N. intracellulaire, tandis que l'acidophilie caractérise les régions riches en protéines mais pauvres en A. N. » (Pollister, 1950).

— Les méthodes basées sur la basophilie des N. P. ne sont donc pas tout à fait spécifiques des A. N. (les mucoprotéines en particulier sont aussi basophiles) ; mais si l'on possède la possibilité de supprimer la basophilie de l'A. N. par un moyen quelconque, on peut en comparant deux lames savoir ce qui revient électivement aux A. N. Nous possédons ces possibilités : il s'agit des *tests enzymatiques et des tests chimiques.*

LES TESTS ENZYMATIQUES emploient exclusivement la ribonucléase et la désoxyribonucléase, celle-ci hydrolyse les désoxyribonucléoprotéines, celle-là les ribonucléoprotéines.

Cet emploi de la ribonucléase en conjonction avec les colorations par les composés basiques, pour déterminer les localisations des A. R. N. sur coupe, fut décrite pour la première fois par Brachet en 1940. Les critiques qui furent adressées à cette méthode, quand l'enzyme employé n'était pas pur, ne sont plus de mise actuellement. La méthode à la désoxyribonucléase fut employée par Leuchtenberger et Pollister en 1949.

Ces deux enzymes ont été obtenus à l'état cristallisé récemment par Kunitz puis Mac Donald.

Le principe de ces tests est simple : on colore une lame avec un colorant basique et une deuxième lame témoin du même tissu après action préalable de l'un ou l'autre enzyme, et on compare les résultats.

Comme la préparation de ces enzymes à partir de pancréas de bœuf exige un chimiste averti et comme d'autre part les enzymes cristallisés sont d'un prix élevé, il est préférable de s'adresser aux TESTS CHIMIQUES dont quelques-uns sont aussi spécifiques et qui sont à la portée de tous.

— On peut remplacer *la ribonucléase par l'acide chlorhydrique N* car, comme l'a montré Pouyet (1949) biochimiquement, cet acide solubilise à chaud à 60° C. en 10 minutes les 80 % de l'A. R. N. sans toucher à l'A. D. N. Employé histochimiquement par de nombreux auteurs : Robinow sur des bactéries, Vendrely et Vendrely-Randavel sur les C. H., il donne des résultats tout à fait comparables aux tests à la ribonucléase.

— On peut remplacer la *désribonucléase par l'acide trichloracétique à chaud à 4 % :* 15 minutes à 90° C. (Schneider, 1945 ;

Pollister et Ris, 1947; Leuchtenberger, Himes et Pollister, 1949).

— Enfin, on peut remplacer les *deux enzymes* par un seul produit chimique :

Soit par l'acide perchlorique comme le préconise Erikson Sax et Ogur et Seshachar et Flick (1949). Une solution à 10 % de cet acide hydrolyse dans un délai variable à 4° C. les R. N. P., et dans un deuxième temps à température élevée il attaque les D. N. P.

Cette technique entre les mains de Vendrely (1951), n'a pas donné les résultats publiés par leurs auteurs.

Meilleure est la technique de Henry et Stacey (1943) aux sels biliaires. Une solution de sels biliaires à 3 % hydrolyse d'abord les A. R. N., puis les A D. N. Cette méthode appliquée par Henry et Stacey en cytochimie bactérienne puis introduite en histochimie animale par Paniel, donne d'excellents résultats comme l'ont confirmé Turchini et Khau Van Kien.

On peut aussi utiliser le chlorure de sodium qui en solution à 0,85 % hydrolyse les R. N. P. et en solution molaire les D. N. P. (Baker, Mirsky et Pollister, 1946).

En employant donc des colorants basiques, sans et après action enzymatique ou chimique, on peut détecter spécifiquement les N. P.

— Mais parmi les *composés basiques,* certains donnent une coloration identique pour les deux types de N. P., ce qui donne un aspect global des N. P. cellulaires sans pouvoir distinguer ce qui revient à l'un ou à l'autre type; d'autres, et les plus intéressants, donnent une coloration différente avec les R. N. P. et les D. N. P. et permettent de déceler sur la même coupe la coexistence des deux A. N.

A cet effet, plusieurs types de colorants s'offrent à nous:

— les colorants décelant les deux types d'acide par *la même couleur,* ex.: l'azur A, le bleu de méthylène, la gallocyanine-alun de chrome...;

— les colorants permettant de différencier les deux aci-

des par *une coloration différente;* parmi ceux-ci on peut s'adresser :

— Au mélange de Unna Pappenheim au vert de méthyle-pyronine ou vert de méthyle-bleu céleste (Brachet). L'A. D. N. a une affinité toute spéciale pour le vert de méthyle et l'A. R. N. pour la pyronine et le bleu céleste comme l'a démontré Brachet d'une façon probante. Mais le mécanisme de cette spécificité est mal connu, pourquoi cette sélectivité alors qu'il s'agit de deux colorants basiques? On pensait autrefois qu'il s'agissait d'un phénomène d'oxydo-réduction mais Pollister et Leuchtenberger (1949), Kurnick (1950), Vercauteren (1950), Vendrely (1950) et Klemperer et coll., ont montré que l'affinité des A. N. pour tel ou tel composant du mélange serait due à leur degré différent de polymérisation; en effet, l'A. D. N. dépolymérisé ne se colore plus par le vert de méthyle mais par la pyronine;

— A des colorants complexes genre mélange de Romanovsky: May-Grünwald-Giemsa, panchrome, Leishman; Mann...;

— A des colorants métachromatiques: type bleu de toluidine, thionine, bleu polychrome..., avec différenciation acétique:

— les D. N. P. se colorent en bleu;

— les R. N. P. se colorent en violet.

Nous n'entrerons pas dans les interprétations diverses de la métachromasie des A. N. qui ont été données par Wiame (1947), Wislocki et Dempsey (1946), Michaelis (1947), Sibatani (1949); Lison et Mutsaars (1950). Signalons seulement qu'il est possible que cette métachromasie soit due au radical « phosphorique » des A. N.

### 3. Détection des autres constituants des N. P.

Ces constituants sont très nombreux et leurs méthodes de détection ne sont pas toujours très spécifiques. On peut ainsi détecter :

— *Les constituants des A. N.:*

— Le phosphore par la méthode de Serra et Queiros-Lopez;

— Les bases puriques par la réaction de la murexide qui décèle l'acide urique, la xanthine, la guanine...

— *Les constituants protéiques :*

— Réactions générales: méthode de Romieu;

— Les histones ou protéines totales par les réactions de Milion modifiées par Pollister et Ris (1947);

— Les acides aminés et les peptides inférieurs, par la ninhydrine;

— Les acides aminés contenus dans les protéines des N. P.:

— arginine: test de Serra (1944);

— tyrosine: réaction de Millon modifiée par Serra et Queiros-Lopez;

— tryptophane: test de Serra et Queiros-Lopez (1946), etc...

B. — Choix des méthodes.

Devant ce grand nombre de techniques notre *choix fut limité par deux facteurs :*

— Le *fixateur standard* utilisé dans les hôpitaux montpelliérains est le Bouin Hollande alcoolique sublimé (B. H. A. S.); il s'agissait donc pour nous de faire un choix judicieux en ne retenant que les méthodes qui, tout en pouvant être appliquées à un tel fixateur, donneraient un résultat optimum car toutes les techniques proposées ne peuvent être réalisées qu'avec une gamme restreinte de fixateurs. Nous les avons cependant toutes essayées et n'avons retenu que celles qui nous donnaient les résultats les plus constants et les meilleurs.

— Le fait que, désirant étudier les rapports étroits qui peuvent exister entre les deux A. N., nous ne devions nous adresser qu'à des méthodes détectant les deux acides par des *colorations contrastées.*

*Nous avons ainsi retenu :*

— Le Feulgen dont le fixateur peut être quelconque, mais dont l'intérêt au niveau de la C. H. est cependant minime;

— Le mélange de Unna qui quoique s'accommodant mal d'une fixation au B. H. A. S. donne des résultats incomparables, les colorations les plus constantes étant obtenues par fixation à l'acétone ou au Helly;

— Les fluorones qui présentent un intérêt de recherche incontestable mais dont l'application standard aux P. B. F. n'est pas souhaitable, car, si elles peuvent à la rigueur se contenter du B. H. A. S. comme fixateur, elles sont limitées par le fait que les temps d'hydrolyse varient d'une coupe à l'autre et donnent ainsi les résultats non entièrement superposables.

— Les colorants complexes, genre Giemsa, nous ont donné d'excellents résultats toujours constants et comparables.

Nous avons employé systématiquement ces trois dernières techniques pour la plupart de nos ponctions-biopsies de foies humains (P. B. F.).

Quant aux méthodes de détection des constituants des N. P., nous ne les avons employées que dans quelques cas particuliers, pour résoudre des problèmes histochimiques connexes.

### C. — Protocole histochimique, matériel et méthodes adoptées.

Nous avons donc travaillé sur du matériel humain composé en majorité de P. B. F. et de quelques nécropsies, en tout 212 échantillons ainsi répartis: 202 P. B. F. et 10 nécropsies.

Les P. B. F. proviennent pour une part des malades en traitement à l'hôpital pendant le cours de ce travail, pour une autre part des riches collections de M. le Professeur Cazal dans lesquelles nous avons abondamment puisé.

**1. Fixations :**

Tous ces prélèvements étaient fixés au B. H. A. S.; certains à l'acétone, d'autres au formol, parfois au Carnoy ou au Helly.

Nous avons appliqué, d'une manière générale, les méthodes rete-

nues, aux coupes fixées au B. H. A. S. réservant les autres fixateurs pour des recherches particulières.

Mais la question primordiale était de savoir si la fixation des N. P. au B. H. A. S. conservait ces constituants dans le même état où ils se trouvent in vivo. Lagerstedt a montré en 1949 que ces fixateurs les conservent en l'état sous lequel ils sont vus en photographie ultra-violette sur coupes fixées par la méthode d'Altmann-Gersh.

2. **Colorations :**

— La liste suivante donne un aperçu de ce **travail de technique:**

1. Colorations standards (hématéine-éosine, Masson parfois);
2. Nucléoprotéines et acides nucléiques:
   a) Feulgen: le matériel contenant du désoxyribose est rouge;
   b) Fluorones: le matériel à désoxyribose est bleu ou bleu bleu violacé; le matériel à ribose est rouge orangé ou rose;
   c) Les colorants basiques:
      — Giemsa acétique:
        les A. R. N. sont violets;
        les A. D. N. sont bleu ciel;
      — bleu de toluidine acétique:
        les A. R. N. sont violets;
        les A. D. N. sont bleu ciel;
      — Vert de méthyle pyronine:
        les A. R. N. sont rouges;
        les A. D. N. sont verts ou vert-bleu;
      — Mann:
        les A. R. N. sont pourpres;
        les A. D. N. sont bleus.

Pour la plupart de ces colorations, nous avons fait des lames témoins après hydrolyse chlorhydrique à chaud (CIH N à 60° C., 15 minutes; ou par l'acide trichloracétique à chaud à 4 %, 15 minutes à 90° C.).

Nous avons aussi quelquefois employé la méthode de Panijel aux sels biliaires.

   d) Recherches des autres constituants des N. P. (phosphore, bases hétérocycliques et divers constituants protéiques) par toutes les méthodes décrites ci-dessus.

3. Glycogène (parfois):
   — Carmin de Best;
   — Gomme iodée;

4. Fer ionisé: méthode de Perls;

5. Lipides:

— Réactions générales (Soudan III, bleu de Nil, imprégnation osmique);

— Phospho-lipides (Ciacco et Smith-Dietrich).

— Toutes les techniques mentionnées sont décrites dans les traités classiques de Lison, de Langeron et de Glick.

## D) HISTOTOPOCHIMIE DES N. P. ET DES A. N. HEPATIQUES

Il est impossible d'aborder cette question sans faire au préalable mention des travaux antérieurs. Le foie est en effet un des organes qui a, probablement à cause de son rôle métabolique unique, le plus attiré l'attention des histologistes et des biochimistes; aussi ne faut-il pas s'étonner du nombre innombrable de travaux qui lui ont été consacrés. *Les recherches en ce domaine ont été poursuivies dans trois voies différentes: morphologique, histochimique et biochimique.* C'est de la comparaison des résultats obtenus par ces moyens différents que sont nées de précieuses indications sur le rôle de la glande hépatique dans le métabolisme des N. P.

Aussi un historique, même sommaire, de ces travaux morphologiques et biochimiques, s'avère-t-il indispensable pour pouvoir envisager le problème dans son ensemble et amorcer la discussion de nos propres résultats. Nous insisterons davantage sur les résultats histochimiques que les techniques récentes ont permis de reconsidérer sous un angle nouveau.

### 1. Historique (1)

Notons immédiatement que les recherches sur les D. N. P. hépatiques ont été peu poussées; en effet, les D. N. P. étant des constituants essentiellement chromosomiques, jouent un rôle principal dans les mécanismes génétiques, et leur étude

(1) L'historique de cette question a été exposé d'une manière presque exhaustive par Lagerstedt (1948) pour les deux premières périodes. Nous lui avons emprunté l'essentiel de cet exposé et nous renvoyons à son mémoire original pour de plus amples renseignements.

ressort davantage du domaine de la cytologie pure, domaine dans lequel le tissu hépatique n'a apporté que peu de renseignements.

Par contre, la question des R. N. P. hépatiques a été singulièrement approfondie dès que l'on commença à soupçonner le rôle que jouait le foie dans le métabolisme protéique, puis plus récemment lorsque, après la découverte du parallélisme entre le métabolisme des R. N. P. de la C. H. et son aptitude à synthétiser les protéines, fut soulevée l'hypothèse du rôle éventuel de ces constituants dans la synthèse des protéines.

— Nous allons examiner brièvement le cheminement des idées à travers les travaux antérieurs. On peut dans cette longue histoire distinguer trois périodes :

a) *Période histomorphologique.*

Elle commence en 1882: Afanassief observe qu'avec un régime carné les C. H. contiennent de petits granules à réaction de Millon positive, et chez les animaux à jeun, des C. H. petites à noyau minuscule; quand ils reçoivent de la nourriture, les C. H. et leur noyau grossissent, avec augmentation parallèle de l'azote total du foie dans le cas seulement d'un régime protidique.

En 1893, Krause découvre dans le cytoplasme hépatique des granules ovoïdes ou en anneaux de 2 μ de diamètre dont il ne peut définir la structure et la nature.

De nombreux auteurs, à cette époque, étudièrent les changements morphologiques du foie sous des régimes différents: Gilbert et Jomier, Schmaus et Albrecht, Léonard, mais c'est Berg qui, à la suite d'études poursuivies de 1903 à 1934, montra que la C. H. peut posséder des inclusions basophiles dont la morphologie varie avec la nutrition de l'animal: elles disparaissent pendant le jeune, avec un régime lipidique en hydrocarboné, et reparaissent avec un régime protidique. On peut facilement les mettre en évidence par des colorants basiques: bleu de toluidine, pyronine, etc..., et par des études histochimiques, au moyen des réactions de Millon, xanthoprotéique, diazoréaction, Berg en arrive à les considérer comme des inclusions protéiques. Elles sont par ailleurs Feulgen négatif. Il leur attribue donc un rôle dans le métabolisme protidique du foie, mais un rôle passif de constituant protidique stocké dans le proto-

plasme ne prenant pas part aux processus métaboliques de la cellule.

En 1904, Koiranski trouve également ces mêmes inclusions et leur attribue un rôle dans la production de la bile dont le noyau serait le point de départ.

Stubel, en 1920, reprend cette étude à l'aide de sa coloration au vert de méthyle-pyronine, et retrouve ce matériel pyroninophile intracytoplasmique qui disparaît au cours du jeûne protéique. Ces granulations n'étaient pas dissoutes par l'épreuve de la salive mais étaient digérées par la pepsine chlorhydrique.

Ceci fut confirmé par Rothman (1924) qui montra que l'azote total des foies d'animaux à un régime carné est supérieur à celui des foies d'animaux soumis au jeûne; puis par Gross (1926).

En 1929, Paschkis voit disparaître ces granules hépatiques par injection d'insuline.

Li en 1936 montre que comme les protides animaux, les protides végétaux sont aptes à faire réapparaître ces structures cytoplasmiques de la C. H. des animaux à jeun, que l'adrénaline fait disparaître.

— Tandis que les vues avancées par Berg étaient confirmées par ces sus-dits observateurs, Aron (1921), Noël (1923), Warasi (1929) et Kremer (1932-33) étaient d'opinion opposée.

Pour Noël, ces granules proviennent des mitochondries filiformes, ce qui est en contradiction avec les résultats de Berg car un changement notable peut être produit dans la morphologie des mitochondries sans causer de changement dans la morphologie des inclusions basophiles.

Aron les voyant au pôle biliaire de la C. H. en fait « les constituants normaux de la bile ».

Kremer reprend cette hypothèse, mais il eut le mérite de montrer le premier *les rapports possibles du nucléole et des inclusions cytoplasmiques de Berg*, car il remarqua leur coloration identique par la pyronine et il en déduisit à juste titre une identité chimique; il suggéra que les nucléoles émigrants du noyau dans le cytoplasme, y constituaient les granulations pyroninophiles lesquelles représenteraient la sécrétion biliaire.

Ceci a été justement critiqué par Berg et Clara en 1934: ces soi-disant migrations nucléolaires ne sont qu'un artéfact dû au rasoir du microtome.

*Conclusion.* — De ces études se détache nettement l'idée que les inclusions basophiles cytoplasmiques de la C. H. sont de nature protidique: ceci est prouvé par les colorations histochimiques spécifiques des protéines.

Ces inclusions N. P., ou blocs ou granules ou corps de Berg, subissent des modifications en rapport avec le régime alimentaire de l'animal et leur rôle physiologique est discuté.

b) *Période histophysiologique: Métabolisme des N. P. hépatiques.*

Nous pouvons distinguer trois phases dans ces recherches. Celles-ci furent menées parallèlement sur deux fronts: chimique d'une part, histologique d'autre part. Cette distinction, bien qu'artificielle permet de cheminer par étapes.

1. *Le foie stocke-t-il les protéines alimentaires?* — Seitz montra le premier (1910) que des animaux gavés de protides après huit jours de jeûne accumulent dans leur foie une grande quantité d'azote protéique.

Ceci fut confirmé par Tichmeneff (1914), Gautier et Thiers (1928), Dittmar (1933), Wetzel, Wollschitt, Ruska et Oestreicher (1935-36), Mac Kay et Bergman (1934), Fenn (1939).

Addis, Poo et Lew (1936) montrent que sept jours de jeûne font baisser de 40 % le contenu hépatique en azote initial, que le foie récupère avec un régime protidique.

Comme ces déterminations d'azote protéique dépendent aussi des variations des lipides et des glucides on essaya d'y remédier en exprimant le contenu azoté de l'organe par rapport au phosphore des A. N. employé comme témoin; ainsi Tichmeneff (1914), Cahn et Bonot (1928), Addis et Poo (1936), Kosterlitz et Cramb (1942, 1944), trouvent ce rapport abaissé pendant le jeûne et redevenant normal avec un régime protidique

Il semble ainsi établi que les animaux à jeûn ou privés de

protides peuvent, quand ils sont remis à un régime carné, stocker des quantités énormes de protéines dans leur foie.

2. *Destinée intracytoplasmique de ces protéines.* — Pendant longtemps on a fait une distinction entre deux types de protéines cellulaires: une s'incorporerait au cytoplasme et serait associée aux processus métaboliques, l'autre serait stockée dans la substance fondamentale sans prendre part au métabolisme cellulaire, et constituerait simplement des protéines alimentaires de réserve.

Ceci impliquant, d'après Pflugger, que les protéines stockées dans la cellule sont un matériel mort non combiné au phosphore comme les protéines métaboliques actives.

Luck en 1936, réussit à isoler du foie quatre fractions protidiques: les globulines III, les euglobulines, les pseudo-globulines et les albumines. De travaux biochimiques complexes il conclut à l'impossibilité de distinguer dans les protéines hépatiques une partie labile de réserve d'une partie structurale de base, toutes les protéines hépatiques participant également à la fonction de stockage.

Subséquemment de nombreux auteurs ont repris le problème. Mac Bride (1943), Kosterlitz et Cramb (1943-44, 1947), établissent que le jeûne diminue les protéines, les phospholipides et les A. N. du foie, toutes ces fractions redevenant normales avec un régime protidique sans changement du nombre des noyaux cellulaires.

De ces investigations chimiques il ressort clairement que les protéines arrivant au foie sont incorporées dans le cytoplasme et non stockées sous forme d'un matériel qualitativement différent des protéines structurales de la cellule.

3. *Variation des N. P. hépatiques sous l'influence de l'alimentation.* — Dès 1882, Kossel montra que la concentration en N. P. hépatiques était chez l'animal à jeûn bien inférieure à celle de l'animal bien nourri. Ces résultats ont été confirmés par de nombreux auteurs et tout récemment par Kosterlitz et Cramb (1943), Davidson et Waymouth (1946), qui établissent qu'après le jeûne les acides nucléiques du foie diminuent parallèlement à une diminution des volumes cellulaires sans change-

ment du nombre de noyaux; et comme l'A. D. N. est localisé au noyau, et l'A. R. N. au cytoplasme, la diminution des A. N. totaux est due à la fraction cytoplasmique.

Davidson et Waymouth d'une part, Campbell et Kosterlitz d'autre part en 1947, établissent que 70 à 90 % des A. N. hépatiques sont constitués par des A. R. N., lesquels seuls diminuent pendant le jeûne, les A. D. N. étant parfaitement stables; ceci fut confirmé par Lee et Tsuboi en 1949.

*Conclusion.* — Il semble donc évident que l'A. R. N. constitue la majeure partie des A. N. hépatiques et que seule cette fraction varie avec l'état alimentaire, les A. D. N. restant inchangés.

c) *Période histochimique moderne.*

Nous avons dit que l'on sait depuis peu que l'A. D. N. est présent dans le noyau seulement et que l'A. R. N. est un constituant du noyau et du cytoplasme (Brachet, Caspersson).

1. — Mais dès 1933, Bensley et Gersh confirment, en employant la méthode de fixation d'Altmann-Gersh, la présence de granules basophiles dans les cellules hépatiques et démontrent leur constitution identique à la substance de Nissl.

En 1940, Brachet, puis Brachet et Jeener en 1944, Davidson et Waymouth, Diesle et Sibatani en 1949, montrent qu'après digestion à la ribonucléase le cytoplasme du foie de rat perd son caractère basophile tandis que son noyau est inaffecté par ce traitement; ceci indique donc que le cytoplasme contient de l'A. R. N. A vrai dire cette technique fut décrite pour la première fois par Van Herweden en 1913 qui employait une nucléase impure.

Avec cette technique, Brachet (1941-42), Brachet, Jeener, Rosseel et Thonet (1946), puis Lagerstedt (1946-1947) montrent que la substance dissoute par la ribonucléase est constituée par les granules découverts par Berg, ce que confirme aussi Deane en 1946.

De tout ceci découle le fait que *la basophilie cellulaire est due à la présence de protéines combinées aux A. N.*, basophilie qui disparaît par digestion avec la ribonucléase.

D'une manière différente, Caspersson (1936-1940), Landstrôm (1943), Caspersson et Wohlfart (1941), Hyden (1943), par l'examen de la capacité absorbante de la cellule à la lumière ultra-violette purent mettre aussi en évidence ces A. N. cellulaires dans le noyau et le cytoplasme de la C. H. Après eux, Davidson et Waymouth, Opie et Lavin (1946), Lagerstedt (1946), Opie (1947-48), établirent que les granules Feulgen négatifs du foie absorbent l'U. V., qu'ils correspondent aux blocs de Berg et qu'ils disparaissent ainsi que les nucléoles après action de la ribonucléase.

2. — *Rapport entre les organites cellulaires et les R. N. P.*

Plus récemment les organites intracytoplasmiques ont attiré l'attention car ils sont riches en A. R. N. Bensley et Hoerr (1934), puis Claude (1943), isolèrent les mitochondries des C. H. par centrifugation et les microsomes formés d'un complexe phospholipide-A. R. N.

Or, les plus petites mitochondries ont 0,5 μ et approchent de la taille des plus gros microsomes 0,3 μ; on ne s'étonnera donc pas si Hoerr (1943), Chantrenne (1947) et Huseby et Barnum (1950), qui ont trouvé dans le foie une gamme pratiquement ininterrompue de particules variant d'une façon insensible au point de vue taille et composition chimique, suggèrent la possibilité que les microsomes de Claude peuvent être des mitochondries broyées pendant la préparation.

Hogeboom, Schneider et Pallade (1948), montrèrent que 19 % de l'A. R. N. du foie entier est localisé dans les mitochondries et 50 % dans les microsomes. Puis Vendrely (1951) démontre histochimiquement qu'une partie seulement du chondriome contient de l'A. R. N.

— Le *rôle possible joué par les mitochondries* dans le métabolisme protidique hépatique a été bien étudié par Mayer, Rathery, Schaeffer (1914), Miller (1926) et surtout Noël (1923), qui trouvent que la concentration mitochondriale augmente avec un régime protidique et diminue avec un régime glucidique.

Kosterlitz (1944) obtient des résultats semblables. Opie (1946-48), étudiant la carcinogénèse hépatique provoquée par

le jaune de beurre montre qu'il y a d'abord disparition des R N. P. protoplasmiques: chromatolyse, qui se régénèrent ensuite: chromatogénèse; pendant la chromatolyse un régime protidique fait réapparaître près du noyau les inclusions basophiles avec augmentation du volume nucléaire et nucléolaire, ces modifications seraient en rapport avec ce qu'il a appelé les cytochondries constituées en partie de mitochondries. Ces cytochondries sphériques à centre éosinophile et à périphérie basophile provoqueraient la formation des R. N. P. cytoplasmiques.

— Par contre, certains auteurs, et non des moindres, sont d'un avis différent.

Dès 1944, Brachet et Jeener émettent l'idée que *seuls les microsomes sont les agents des synthèses protéiques.* De nombreuses preuves plaident en faveur de cette théorie. Borsook, Deasy, Haagen-Smit, Keighley et Lowy (1950), puis Hultin (1950) et Keller (1951), montrent que les acides aminés marqués sont incorporés beaucoup plus rapidement par les microsomes que par les mitochondries.

Par ailleurs, Vendrely et Vendrely (1950-1951), montrèrent que la teneur en A. R. N. des mitochondries hépatiques est constante dans le jeûne protéique tandis que les variations de l'A. R. N. portent principalement sur la fraction contenue dans les microsomes.

Sur le plan histochimique, Brenner (1947), montre que les microsomes correspondent aux R. N. P. cytoplasmiques; pour lui, les corps de Berg sont dus à l'agrégation de concentrations diverses de microsomes. Lagerstedt (1949), par ultra-centrifugation, met morphologiquement en évidence la localisation des microsomes dans la même couche intracellulaire que celle des corps de Berg et aboutit à la même conclusion que Brenner.

— Il reste à préciser le *rôle du nucléole.*

Caspersson et son école furent les premiers à mettre en évidence le fait que toute cellule en synthèse protidique possédait un gros nucléole; il fit le rapprochement et en induisit que celui-ci devait jouer un rôle dans la synthèse des R. N. P. en synthétisant des histones qui diffuseraient dans le cytoplasme

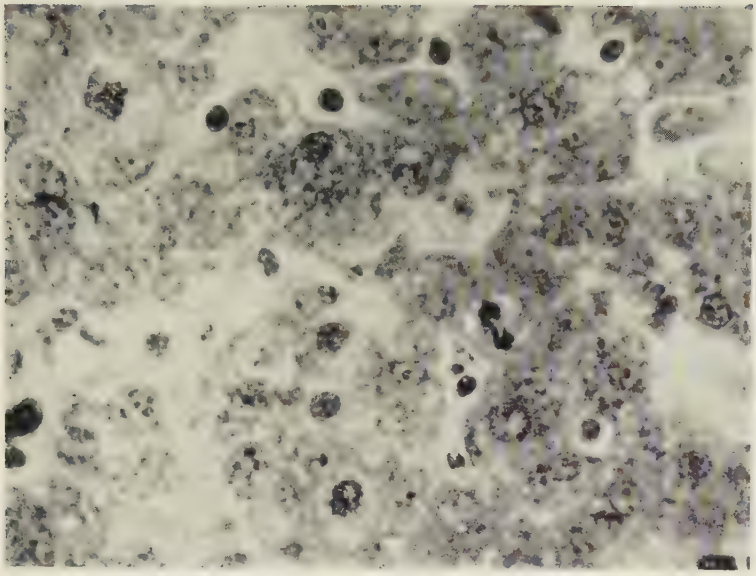


**PHOTO 19. — Mitoses anormales dans une mononucléose infectieuse**

Au centre, une cellule en mitose à double pont chromatique entre les deux lots de chromosomes fils en anaphase. Remarquer la clarté cytoplasmique de cette cellule tranchant sur les cellules voisines, seuls quelques blocs de Berg persistent au niveau des filaments chromatiniens. Ces mitoses aboutissent à des images de pseudoamitoses (voir photo 20). Sur cette même photo, deux autres mitoses anormales en métaphase à chromosomes en amas (Giemsa acétique).

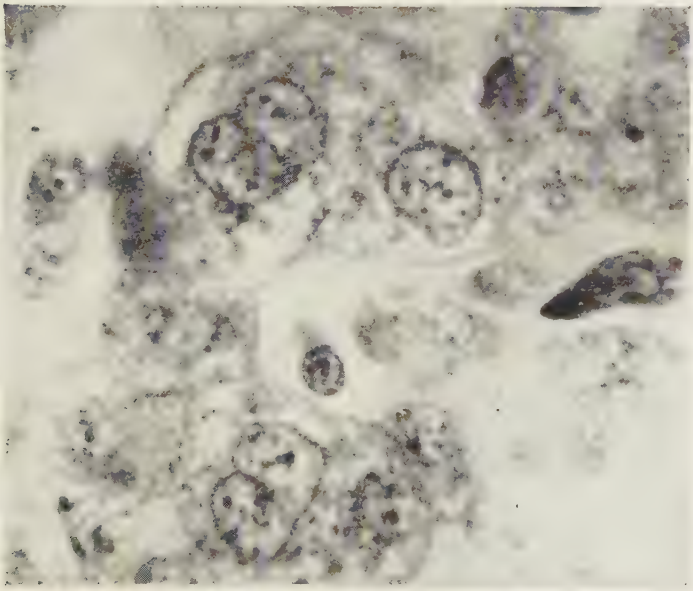


**PHOTO 20. — Aspects pseudoamitotiques.**

En haut et en bas, deux cellules à noyaux incisés et fissurés. Ces images correspondent à des stathmotélophases. Mononucléose infectieuse (Giemsa acétique).

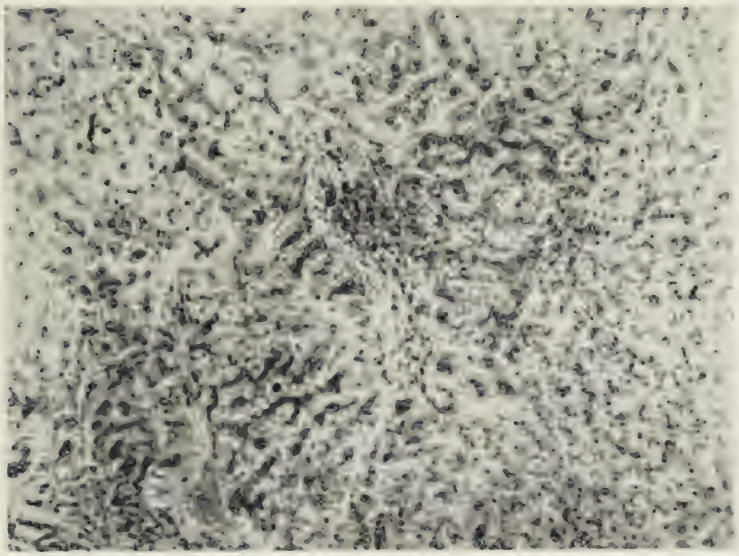


**PHOTO 21. — Cirrhose pigmentaire**

S'irradiant autour d'une bande fibreuse, les travées hépatiques à forte surcharge pigmentaire ferrique. Charge ribonucléique protoplasmique fortement diminuée, mais cependant conservée dans les cellules contenant une concentration pigmentaire faible (Giemsa acétique).

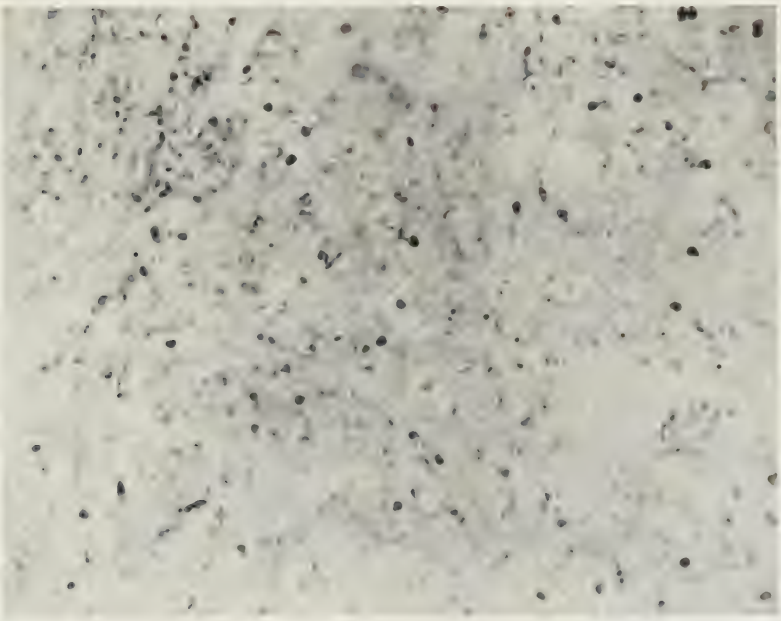


**PHOTO 22. — Aspect typique de polycorie glycogénique**

La préparation a un aspect clair. Seules les limites cellulaires sont dessinées en damier. Les noyaux centrent chaque cellule et sont entourés d'une mince atmosphère de blocs de Berg avec quelques prolongements intra-cytoplasmiques en rayon de roues. (Giemsa acétique.)

en provoquant la synthèse des R. N. P. cytoplasmiques, lesquelles contribueraient à l'anabolisme protidique.

Mais Brachet et Jeener, s'ils admettent ces relations entre le nucléole et les R. N. P., pensent que le noyau intervient dans cette synthèse; les A. R. N. passeraient dans le cytoplasme sur les mitochondries ou les microsomes provoquant à leur tour la synthèse des R. N. P. cytoplasmiques. Cette interprétation a le mérite de cadrer complètement avec les idées des cytologistes qui attribuent aux éléments figurés du cytoplasme une activité sécrétrice.

Tous les auteurs ont par la suite noté ces relations: blocs de Berg-nucléole; Lagerstedt (1947-1949) a montré que lors de synthèse protéique accrue il y a accumulation de R. N. P. autour du noyau avec augmentation concomitante du volume nucléolaire. Stowell (1948) note de même pendant la régénération du foie l'augmentation des volumes nucléaires et nucléolaires et du nombre des blocs de Berg, tandis qu'Opie (1946-48), fait les mêmes remarques dans la cancérisation de la C. H.

Tout ceci rejoint donc l'idée de Kremer (1932) qui fut le premier à mentionner *les rapports possibles du nucléole et de la substance basophile cytoplasmique,* mais malheureusement il basa son étude sur l'affirmation erronée d'une migration nucléolaire vers le cytoplasme pour prendre part directement à la synthèse des R. N. P. cytoplasmiques.

3. — *Travaux histochimiques sur les foies humains pathologiques.* Ils sont rares et jusqu'à ces dernières années il n'y avait pas d'étude d'ensemble.

Rich et Berthrong (1949) ont étudié les infections hépatiques aiguës sur quelques cas d'autopsies.

De Brux et Marchand (1949) et Marchand (1950) observent et décrivent les corps basophiles cytoplasmiques de foies humains provenant d'autopsies ou de ponctions-biopsies, et mentionnent un cycle secréteur.

Mac Kay et Farrar (1950) font une étude d'ensemble sur des foies prélevés par autopsie tandis que Szanto et Popper,

puis Farber, Koch-Weser, Szanto et Popper (1951), font des études d'ensemble sur des foies pathologiques d'origine variée.

Tous ces auteurs ont noté des variations de concentration des corps de Berg dans les foies pathologiques.

Nous reparlerons de ces divers travaux lors de la discussion, notons seulement qu'*il y a toujours un parallélisme étroite entre la taille des nucléoles et la synthèse des R. N. P. cytoplasmiques*, les constituants R. N. P. nucléaires restant toujours invariables.

*Récapitulation*

On peut résumer cette longue série de travaux en quelques conclusions :

1° Les inclusions basophiles cytoplasmiques des C. H. ou blocs de Berg, sont formées, comme les nucléoles, de R. N. P.; elles diminuent ou disparaissent pendant le jeûne protidique ou dans certains cas pathologiques et reparaissent avec un régime riche en protéines ou avec la convalescence;

2° Les D. N. P. hépatiques sont d'une stabilité extrême et sont inaffectés par le jeûne, les maladies, etc...;

3° Il y a un rapport étroit entre les nucléoles et les R. N. P. cytoplasmiques, mais les liens existant entr'eux sont discutés. Pour certains, les R. N. P. cytoplasmiques seraient d'origine endonucléaire, pour d'autres exonucléaires;

4° Il y a concordance entre le métabolisme des A. N. et la synthèse protidique, mais on ne peut établir un lien biochimique entre les A. N. et les protéines.

## 2. Recherches histochimiques personnelles sur les N. P. et les A. N. hépatiques

### 1. Foie humain normal.

Les coupes obtenues par l'une quelconque des méthodes employées sont très belles et très démonstratives, les différences

de coloration entre les deux A. N. permettent d'emblée d'en différencier les topographies exactes. (Photo 15.)

Les travées cellulaires ressortent nettement et dessinent un lacis sombre piqueté par les noyaux, tranchant nettement sur les sinusoïdes et les espaces portes plus clairs.

Nous avons effectué les colorations précitées sur de très nombreux prélèvements de foies normaux adultes et infantiles, une cinquantaine environ, ce qui nous a permis de nous faire une idée assez exacte de la distribution topographique des N. P. du foie normal.

### a) Caractéristiques cytochimiques élémentaires.

Passons en revue les divers éléments cellulaires constituant le tissu hépatique.

#### 1. *Cellule hépatique* .

Ce qui frappe d'emblée est la présence dans le cytoplasme des C. H. d'inclusions très basophiles de taille, de forme et de topographie diverses prenant intensément les colorants basiques: violet par le Giemsa, rouge par la pyronine. (Photo 15.)

Les C. H. sont, après les cellules pancréatiques et les cellules de la muqueuse intestinale gastrique, les plus riches de l'organisme en R. N. P. cytoplasmiques.

— *Le noyau* est de morphologie classique rond ou ovale, de topographie le plus souvent centrale ou paracentrale.

Son fin reticulum chromatique plus dense à la périphérie, où il constitue la membrane nucléaire chromatique, est constitué de D. N. P. apparaissant en vert franc au vert de méthylepyronine, avec parfois quelques caryosomes volumineux.

Remarquons tout de suite que certains noyaux paraissent avoir une concentration en D. N. P. supérieure à celle d'autres noyaux, au niveau du reticulum chromatique ou sous forme de blocs caryosomiques plus nombreux ou plus gros.

Les R. N. P. nucléaires entrant spécifiquement dans la constitution des nucléoles sont nettement différents puisqu'ils

prennent la pyronine et sont de ce fait intensément colorés en rouge.

Grâce à ces colorations différentielles il est facile de se rendre compte que les conceptions classiques attribuant au noyau de la C. H. un ou parfois deux nucléoles sont erronées. Nous avons fait des numérations sur des foies normaux dont les moyennes peuvent se résumer comme suit:

— Dans la zone centrale, le nombre moyen de nucléoles par noyau est de 1,8;

— Dans la zone intermédiaire, il est de 2,5;

— Dans la zone périportale, il est de 3.

Ces nucléoles sont toujours sphériques mais de taille assez inégale et de répartition intranucléaire variable. Il faut noter que la chromatine forme souvent autour d'eux des organismes de forme variée: triangulaires, pyramidaux, ovalaires, pouvant parfois former un anneau complet autour du nucléole; ces formations que les Anglo-Saxons ont appelé « chromatine associée au nucléole » sont aussi désignées sous le nom de « nucléoles complexes ou amphinucléoles » puisque caryosomes et plasmosomes y sont associés.

Lorsque ces formations chromatiques sont très nombreuses ou forment un large anneau autour des nucléoles, la réaction de Feulgen colore cet ensemble et peut faire croire que les nucléoles sont composés de D. N. P.; il n'en est rien, car, en faisant varier la mise au point, il est toujours possible de déceler un anneau central non coloré qui représente le nucléole.

Tel est l'aspect le plus constant du noyau des C. H.; leur volume est à peu près identique pour toutes les cellules bien que l'on puisse physiologiquement déceler une anisocaryose discrète que nous essayerons d'expliquer ultérieurement. Signalons par ailleurs que les noyaux hépatiques des foies infantiles ont un volume inférieur à ceux des noyaux de foie adulte.

— Mais à côté de ce noyau type décrit, on découvre ça et là quelques noyaux colorés en rouge au vert de méthyle pyronine; ils ont la même morphologie générale mais leur structure interne est moins facilement décelable, leur coloration est homo-

gène, laquée, seuls les nucléoles qui sont toujours très gros peuvent être distingués.

Entre ces deux types extrêmes, il y a de multiples formes intermédiaires, que nous décrirons plus loin.

— Quant *au cytoplasme*, il révèle une structure inhabituelle. Alors que l'hématéine-éosine le colore le plus souvent en rose sans qu'il soit possible d'y déceler aucune structure, les colorants basiques révèlent des organites à structure bien définie dont nous avons déjà parlé: *les blocs et les granules de Berg.*

Ces organites sont très polymorphes; ils paraissent parfois sous forme de grains homogènes arrondis, de taille fort différente, de 0,5 à 4 μ de diamètre, parfois tubulés et sinueux, en virgule ou annulaires limitant des vacuoles centrales et correspondant aux cytochondries d'Opie, parfois très petits, à la limite de la visibilité et réduits sous l'aspect d'une fine poussière que certains ont assimilé aux microsomes.

Leur localisation intra-protoplasmique est très variable; le plus souvent ils affectent une disposition périnucléaire en couronne pouvant masquer le noyau, d'autres fois ils sont diffus et disséminés dans tout le protoplasme. Enfin, on les voit rarement localisés le long de la membrane cellulaire.

Mais ces variations topographiques n'ont pas lieu au hasard, elles sont en général groupées zonalement et affectent une disposition différente dans les trois zones du lobule (Photo 15):

— la zone centrale dont les C. H. sont les plus riches en corps basophiles, ceux-ci se présentant sous forme de grosses granulations de 2 à 4 μ, ou de filaments plus ou moins allongés;

— la zone intermédiaire contient des corps basophiles plus petits et moins nombreux;

— dans la zone périphérique, la basophilie cytoplasmique est diffuse et les corps de Berg sont très rares ou absents ou quelquefois sous une forme finement fibrillaire.

La localisation intracellulaire de ces corps basophiles est donc souvent caractérisée par leur étroite relation avec le noyau.

— Ainsi distribuées et comprises ces relations entre les corps basophiles, le noyau et la grosseur des nucléoles nous incitent à décrire un *cycle de sécrétion des A. R. N. de la C. H.* car il est possible de trouver tous les stades intermédiaires.

1. Premier stade ou stade de synthèse protéique: caractérisé par un noyau de grande taille, vésiculeux, contenant d'énormes nucléoles associés ou non à des caryosomes; ce noyau paraît pauvre en D. N. P. La distribution intracytoplasmique des corps basophiles est diffuse, ou plus souvent périnucléaire, mais les blocs de Berg sont toujours en forte concentration.

2. Deuxième stade ou stade de repos: à noyau plus petit, à chromatine diffuse contenant de petits nucléoles.

Les corps basophiles intracytoplasmiques sont nombreux, mais plus dispersés, le cytoplasme des C. H. pouvant être parfois uniformément granulaire.

3. Troisième stade ou stade de sécrétion: il peut présenter plusieurs aspects suivant l'évolution. On voit apparaître dans le noyau de petites granulations ribonucléiques dont les relations avec la chromatine et le suc nucléaire sont indistinctes. Ces granulations se multiplient peu à peu parallèlement à une augmentation du volume des nucléoles et deviennent si nombreuses qu'elles finissent par obscurcir la chromatine et donnent au noyau un aspect homogène laqué, coloré en rouge au vert de méthyle pyronine, en orange au Mann, en violet au Giemsa acétique.

D'autres fois les R. N. P. nucléaires se rassemblent à un pôle du noyau en réalisant ce que Brachet a appelé les « noyaux bariolés ».

Les corps basophiles cytoplasmiques sont absents ou très rares. Dans l'aspect ultime de ce stade la basophilie protoplasmique disparaît dans une zone annulaire concentrique au noyau.

4. Quatrième stade ou stade d'excrétion: le noyau diminue de volume, il prend un aspect chiffonné, et devient anfractueux; ces modifications morphologiques doivent être dues à des contractions nucléaires; à ce moment là les R. N. P. nucléaires passent dans le cytoplasme. Mais ce stade que l'on voit

rarement doit être très court. Il est difficile de préciser les modalités du franchissement de la membrane nucléaire.

Les corps basophiles intracytoplasmiques forment alors autour du noyau une auréole foncée tranchant nettement sur le cytoplasme périphérique légèrement basophile.

Le noyau reprend alors son aspect du premier stade à chromatine finement réticulaire. Les nucléoles sont toujours volumineux.

Cette description n'a évidemment que la valeur d'un schéma théorique, tous les intermédiaires sont possibles.

Signalons que dans le foie normal, le stade 2 et le stade 1 dominent et sont même souvent exclusifs.

— *Après action de l'HCl.N.* la basophilie cytoplasmique et nucléolaire disparaît, mais cette digestion ne révèle pas d'espace vide, c'est-à-dire que les contenus cellulaires sont toujours visibles, le cytoplasme n'est pas optiquement vide, mais sa basophilie s'est transformée en acidophilie; cette propriété nouvelle étant due aux protéines basiques des N. P. à ribose qui restent fixées au protoplasme fondamental alors que les ribonucléotides ont disparu.

— Notons la richesse fort différente en *D. N. P. de certains noyaux;* bien qu'il faille se montrer très circonspect quand il s'agit d'appréciations semi-quantitatives des charges nucléaires en N. P., il est pourtant facile de distinguer certains lacis chromatiques plus concentrés que d'autres. Ces différences sont sans rapport avec la topographie zonale et la charge cytoplasmique en A. R. N.

*Cellule hépatique en multiplication*

Nous rappelons que les figures de division ne sont rencontrées qu'exceptionnellement dans les foies normaux; nous en avons cependant observées quelques-unes que nous décrirons rapidement:

— *Mitose :*

Nous avons pu observer les différentes phases du phénomène:

— Dès le début de la prophase, les chromosomes sont déjà constitués et les nucléoles persistent. Les corps basophiles cytoplasmiques sont présents mais leur concentration est faible; ils sont le plus souvent granulaires.

— A la prémétaphase, la membrane nucléaire a disparu ainsi que les nucléoles, les chromosomes présentent de fortes réactions des D. N. P. Les corps de Berg ont totalement disparu, et, jusqu'à la reconstitution des deux noyaux fils, le cytoplasme prendra un aspect tout à fait anormal sans jamais devenir cependant franchement acidophile: il se présente sous forme d'un fin granité ayant conservé une très légère basophilie et tranchant de ce fait sur les C. H. qui l'entourent.

— Le fuseau est souvent visible à la métaphase et il est parfois possible d'apercevoir quelques granulations basophiles persistantes entre les filets de ce fuseau.

— Enfin au cours de la télophase. on voit se reconstituer les nucléoles. Les deux cellules filles formées sont très légèrement basophiles et il est curieux de remarquer qu'elles ne présentent alors pas toutes deux ensemble les phases de sécrétion R.N.P.; il y a toujours un noyau qui reconstitue son stock avant l'autre, ce qui se traduit par une anisocaryose et une anisochromie nucléaire.

Pendant tout le cours du processus, la cellule a perdu sa charge glycogénique, ce constituant cytoplasmique ne persiste plus que sous forme d'un mince croissant périphérique.

— *Amitose :*

Elle s'effectue par les deux procédés classiques de clivage ou d'étirement; le processus concerne aussi les nucléoles: ceux-ci perdent leur forme sphérique, s'étirent et s'étranglent en deux portions de volume à peu près égal.

Pendant tout le cours du phénomène, les R. N. P. cytoplasmiques ne disparaissent pas, elles semblent se répartir de façon égale entre les deux cellules filles.

2. *Cellules de Kupffer.*

Elles sont très peu visibles dans des conditions normales; on peut cependant préciser quelques points.

Leur noyau présente une structure classique à fin reticulum chromatique et un ou plusieurs nucléoles.

Mais leur cytoplasme ne contient pas de R. N. P., il est franchement acidophile quelle que soit la forme ou la taille de la cellule.

3. *Espaces portes.*

Les cellules épithéliales des conduits biliaires ne contiennent que rarement de corps basophiles.

Les infiltrats sanguins: lymphocytes et plasmocytes présentent un cytoplasme intensément basophile.

Quant aux histiocytes et aux fibroblastes leur protoplasme ne révèle qu'une très légère basophilie diffuse.

b) Discussion.

Nous ne reviendrons pas sur les premiers travaux, antérieurement résumés, concernant les N. P. du tissu hépatique, nous nous contenterons des travaux les plus récents.

— Opie (1946) et Lagerstedt (1949) décrivirent avec précision les corps basophiles de la *cellule hépatique du rat*, leur morphologie et leur topographie; leurs descriptions sont tout à fait concordantes avec les nôtres effectuées sur le foie humain.

— Mais plus intéressants sont les travaux concernant les *foies humains normaux.*

— Notons immédiatement que si Lagerstedt trouve aux *corps de Berg* une disposition le plus souvent périnucléaire, ce n'est pas ce que l'on voit en général dans les foies humains, dits normaux, examinés. Ceci ne doit pas nous surprendre car tout malade hospitalisé, présentant un foie histologiquement normal aux examens standards, accuse déjà de petites réac-

tions parapathologiques; il serait intéressant de vérifier ce fait sur des ponctions de foie de sujets tout à fait sains.

Ces légères différences ont été notées par tous les auteurs qui ont étudié les corps basophiles des foies humains normaux.

Sibatani (1949) a décrit sous le nom de « type I », l'aspect standard de la C. H. humaine qui présente un cytoplasme hétérogène et de petites cytochondries; les cellules centro-lobulaires ont un protoplasme en général plus condensé.

Dans le type II ou « réactif » la distribution de l'ergastoplasme est homogène. Dans le type III ou « catastrophe », les cytochondries sont vésiculaires; il y a désintégration de protéines. Enfin, le type IV ou « régénération » présente un ergastoplasme périnucléaire et des vacuoles aqueuses.

Il ne précise pas les aspects nucléaires correspondants.

Mac Kay et Farrar (1950) décrivent aux C. H. normales de petits noyaux et nucléoles, avec un cytoplasme dont l'ergastoplasme est le plus souvent diffus avec parfois des corps plus allongés et perpendiculaires à la membrane nucléaire.

Plus près de nous, Szanto et Popper (1951), sur des P. B. F. et des foies animaux ont décrits plusieurs aspects de corps basophiles intracytoplasmiques en correspondance parfaite avec nos propres descriptions.

— Au sujet des *noyaux hépatiques normaux* remarquons que tous les auteurs sont d'accord pour leur attribuer de légères variations volumétriques: Lagerstedt (1949), Sibatani (1949), Mac Kay et Farrar (1950)..., et une charge en D. N. P. variable. Tout récemment Pasteels et Lison, puis Swift (1950) ont décrit trois sortes de noyaux cellulaires dont le volume et la concentration en D. N. P. sont en rapport avec la polyploïdie.

— Mais il y a peu d'auteurs qui ont mentionné *un cycle hépatique de sécrétion nucléaire ribonucléique.*

Cependant, en 1949, Rumgantsew décrit des corpuscules sphériques Feulgen négatif dans quelques noyaux entre les fibres chromatiniennes chez l'animal, remis à un régime alimentaire normal après un jeûne protidique.

Stowell et Lee (1950) décrivirent aussi l'apparition de corps

pyroninophiles intra-nucléaires dans la régénération du foie de souris intoxiquées au tétrachlorure de carbone: « the nuclear changes are striking around the fourth day when not only the nucleoli but also many of karyosomes or nucleolus-associated-chromatin structures are somewhat pyroninophilic ».

Plus précises sont les descriptions de De Brux et Marchand (1949) et Marchand (1950). Ces auteurs ont étudié des foies de rat soumis à des régimes alimentaires variés et quelques foies humains prélevés par ponction-biopsie. Ils décrivent un cycle de sécrétion ribonucléique à peu près semblable sur des prélèvements colorés au Giemsa acétique. Ils ont pu ainsi distinguer trois stades cellulaires chez des animaux normaux, qu'ils ont retrouvé sur des foies humains.

— Un premier stade de repos, avec des noyaux de taille moyenne contenant un ou plusieurs nucléoles et des corps basophiles intracytoplasmiques granulaires, de topographie diffuse.

— Un deuxième stade d'activité, à noyau volumineux et clair, à membrane nucléaire épaissie et à gros nucléoles. Les corps basophiles intracytoplasmiques sont moins nombreux et surtout disposés à la périphérie.

— Un troisième stade d'excrétion avec une couronne péri-nucléaire d'A. R. N. et un seul nucléole dans un noyau clair à membrane mince.

Les foies normaux étant caractérisés par la prédominance des stades II et III.

Mais ce travail, s'il a le mérite de relier les différents aspects morphologiques que présente la C. H., est gravement entaché à la base d'une erreur histochimique, car les auteurs précités considèrent la membrane nucléaire constituée d'A. R. N., aussi les aspects décrits ne correspondent-ils pas à la réalité.

La synthèse de l'A. R. N. ne se fait pas en effet au niveau de la membrane nucléaire par épaississement de celle-ci, mais d'une façon diffuse à toute l'aire nucléaire et sans rapport direct avec les nucléoles.

On peut, semble-t-il, expliquer en partie l'absence de confirmation de ce cycle sécréteur par le fait que la majorité des

auteurs explore le métabolisme de la C. H. au moyen de colorants basiques détectant les deux acides par une même couleur; on ne peut de ce fait saisir les topographies différentes des deux A. N.

Malgré ce, la discussion de ce cycle sécréteur nucléaire ribonucléique, tel que nous l'avons décrit, s'impose. Nous ne nous cachons pas que la coloration au vert de méthyle pyronine peut donner après une fixation au B. H. A. S., et même au Helly et au Zencker, de fausses images. Nous avons cependant retrouvé des noyaux prenant la pyronine après fixation au Carnoy (le meilleur fixateur pour cette coloration); et le Giemsa acétique et le Mann, qui s'accomodent très bien du B. H. A. S., nous ont montré d'une façon constante la présence de noyaux violets ou orangés. Les diverses actions dénaturantes des fixateurs et des colorants sur les protéines nucléaires ne sont pourtant pas niables.

Par ailleurs, l'apparence rouge des noyaux, au vert de méthyle-pyronine, n'est pas due à la charge ribonucléique du protoplasme sus ou sous-jacent, car celui-ci se présente toujours avec un aspect granulaire, la coloration des noyaux étant toujours diffuse et homogène.

Pour ces diverses raisons, et compte tenu des réserves formulées, nous pensons que notre interprétation, si elle mérite confirmation, est légitime.

Les différents aspects de ce cycle sont, répétons-le, rares sur les foies normaux. Nous serions tenté de l'interpréter comme un processus déjà anormal.

— Au sujet des *mitoses*, Clara en 1934 fut le premier à noter la disparition des corps de Berg pendant la caryocinèse, Brachet et coll. (1946), puis Brachet (1947), ont noté aussi cette dissémination des blocs de Berg avec un aspect cytoplasmique granulaire pendant le processus, tandis que parfois quelques corps de Berg persistants peuvent être aperçus pendant l'anaphase accrochés au fuseau.

Opie (1948), Sibatani (1949), Stowell et Lee (1950), font les mêmes remarques.

En ce qui concerne les chromosomes, Brachet (1947), puis

Jacobson et Webb (1951), notent que si, à la prophase, les chromosomes ne contiennent que des D. N. P., il semble qu'ils possèdent en outre à la métaphase et à l'anaphase des R. N. P., comme le montre une coloration au May-Grunwald Giemsa, constituant qu'ils perdront pendant la télophase et qui se transforme peut-être en D. N. P.

Ceci est en accord parfait avec les travaux récents (1951) de Lison et Pasteels qui par photométrie histologique ont montré que, contrairement à ce que décrivit Reis sur des chromosomes végétaux, la teneur en A. D. N. des chromosomes augmente à la télophase seulement et non à la prophase.

— Nous n'envisagerons pas la question du *rapport des corps de Berg avec les microsomes et les mitochondries*, question dont nous avons déjà parlé antérieurement. Rappelons cependant que Opie (1946-48) prétend que les cytochondries (mitochondries pro parte) sont le substratum anatomique de la synthèse des R. N. P. cytoplasmiques, ce qui n'est pas en accord avec les conclusions de la majorité des autres auteurs. (Vendrely, 1951).

c) Conclusions.

Nous pouvons, en terminant cette étude sur les N. P. de la C. H. humaine, conclure :

— Que la C. H. normale humaine contient de nombreux blocs de Berg, de topographie intracytoplasmique et de morphologie variables;

— Ces blocs de Berg font partie des formations ergastoplasmiques de Prenant et sont constitués de R. N. P.;

— Les relations entre les noyaux et les corps de Berg nous ont permis de décrire leur origine nucléaire probable et de distinguer quatre stades dans le fonctionnement de la C. H.: stade de synthèse protéique; stade de repos; stade de sécrétion; stade d'excrétion nucléaire. Le premier et le deuxième stade prédominent dans les foies humains normaux.

— Il y a parallélisme entre la diminution de la taille du nucléole et la basophilie cytoplasmique.

## 2. Foies humains pathologiques.

Avant de passer en revue les différents aspects histologiques propres à chaque maladie hépatique, nous étudierons la topographie des A. N. dans les lésions élémentaires des différents constituants du tissu hépatique.

Car les lésions du foie observées en pathologie hépatique ne présentent que rarement une spécificité étiologique, c'est donc sous l'angle de l'histophysiopathologie de cet organe qu'il convient le plus souvent de les étudier si l'on veut en saisir l'exacte signification ou du moins un aspect des troubles fonctionnels qui en découlent.

### A) Les N. P. et les A. N. dans les lésions hépatiques élémentaires

Nous allons les examiner au niveau des trois éléments classiques constituant le tissu hépatique avec une mention spéciale à l'élément noble par excellence: la cellule parenchymateuse.

#### I. — CELLULE HEPATIQUE

Les lésions de cet élément sont les plus intéressantes, d'abord parce qu'elles sont souvent précoces; ensuite parce que la C. H. jouant un rôle prédominant dans le métabolisme du foie, des lésions de cet élément traduiront un trouble fonctionnel métabolique indiscutable.

Elles portent essentiellement sur le noyau ou le cytoplasme ou bien intéressent ces deux formations à la fois.

##### 1) *Anisocaryose et anisochromie nucléaire.*

— *L'anisocaryose,* ou inégalité des volumes nucléaires, est mentionnée par tous les auteurs qui se sont occupés d'histopathologie hépatique comme une des « lésions les plus précoces de la C. H. ».

Il est évident que nous n'incluons dans cette définition que l'anisocaryose correspondant à la C. H. fonctionnellement acti-

ve, à l'exclusion des inégalités nucléaires rencontrées dans les lésions nécrotiques de la cellule.

Il est vraiment curieux de constater que les interprétations antérieures de ce phénomène sont de la plus haute fantaisie: anomalie nucléaire pour les uns, elle ne serait pour d'autres que l'effet de charges protoplasmiques irrgulières et pour d'autres enfin un signe de disfonctionnement hépatique prouvant la perturbation du métabolisme cellulaire (Mirouze, 1951).

Nous avons mentionné dans le foie normal une légère anisocaryose physiologique correspondant, pensons-nous, à un état fonctionnel nucléoprotéique différent, et dans ce cas là les variations de taille nucléaire sont réduites, n'allant jamais au-delà d'une augmentation du simple au double.

Or, il arrive que l'on aperçoive très souvent sur des P. B. F. d'origines les plus diverses, des inégalités nucléaires parfois énormes, variant du simple au quintuple; ces variations ont toujours lieu en hyper, c'est-à-dire que l'on aperçoit à côté de noyaux de taille normale des noyaux géants dans une cellule par ailleurs normale.

La topographie de ces cellules giganto-nucléaires est très variable; le plus souvent périportale mais parfois aussi médiane ou même centro-lobulaire; ces inégalités nucléaires s'accompagnent quelquefois d'une hypertrophie cytoplasmique si bien que le rapport nucléoplasmatique peut rester constant.

La distribution intracytoplasmique des corps de Berg est des plus variables, ainsi que leur concentration mais ils affectent souvent une distribution périnucléaire.

La valeur de ces gros noyaux correspond, croyons-nous, au cycle fonctionnel nucléique, mais à un cycle fonctionnel exagéré; *il n'y a pas de perturbation métabolique, mais un hyperfonctionnement,* une hyper-sécrétion nucléaire comme montrent les colorations spécifiques des A.R.N.: la C. H. est en hyperfonctionnement; c'est donc un signe d'hyperhépatie portant sur la genèse des protéines cytoplasmiques par l'intermédiaire des corps de Berg.

Ce phénomène est précoce et traduit probablement un processus comparable aux phénomènes d'irritation hématopoïétique.

— A cette notion d'anisocaryose, nous rattachons celle que nous appelerons « *Anisochromie nucléaire* », et dont aucun auteur n'avait jamais encore mentionné l'existence à notre connaissance.

Nous avons souvent été frappé à l'examen de P. B. F. colorées à l'hématéine-éosine de l'inégalité de coloration des noyaux; normalement la teinte de la chromatine est rose-violet ou violet-bleu, les nucléoles peu visibles sont rose-sale. Or, on trouve parfois des noyaux hypertrophiés ou de taille normale d'un bleu franc.

Cette anomalie est facilement explicable maintenant que nous connaissons l'existence d'un cycle fonctionnel R. N. P. entre le noyau et le cytoplasme. En comparant en effet des coupes identiques colorées au vert de méthyle-pyronine et à l'hématéine-éosine, il est facile de se rendre compte que l'anisocaryose et l'anisochromie ne sont que la traduction d'un seul et même phénomène.

— Les interprétations personnelles que nous donnons de ces deux anomalies n'ont pas la prétention de régler la question de tous les gros noyaux trouvés dans le parenchyme hépatique. Nous avons eu l'occasion de voir d'énormes noyaux ne contenant, en dehors des nucléoles, aucune trace d'A. R. N., et il est probable que cette anisocaryose non sécrétrice est en rapport avec la polyploïdie nucléaire, problème dont nous reparlerons.

*En conclusion: l'anisocaryose et l'anisochromie nucléaire* ne sont pas, la plupart du temps, des anomalies nucléaires, conséquences de la perturbation du métabolisme cellulaire, mais *ne sont que la traduction d'une intense synthèse protéique cytoplasmique*, signe le plus précoce et le plus sensible d'une irritation hépatique quelconque et correspondant à une hyperhépatie ribonucléoprotéique.

2) *Anomalies nucléolaires et « nucléoles vacuolaires »*

Ces anomalies n'ont pas, semble-t-il, retenu l'attention des histologistes et pourtant elles sont précoces, variées et précèdent le plus souvent des altérations plus graves de la cellule.

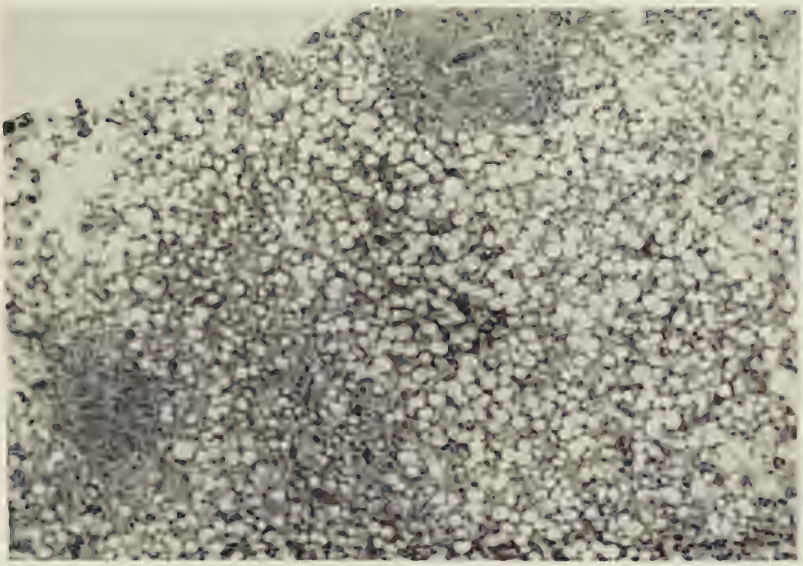


**PHOTO 23. — Miliaire tuberculeuse avec stéatose massive**

L'appréciation visuelle de la basophilie du tissu hépatique permet de se rendre compte que quoique diminués en nombre les corps de Berg sont toujours présents, rassemblés autour des noyaux. Remarquer la légère basophilie homogène des cellules de Langhans. (Giemsa acétique).

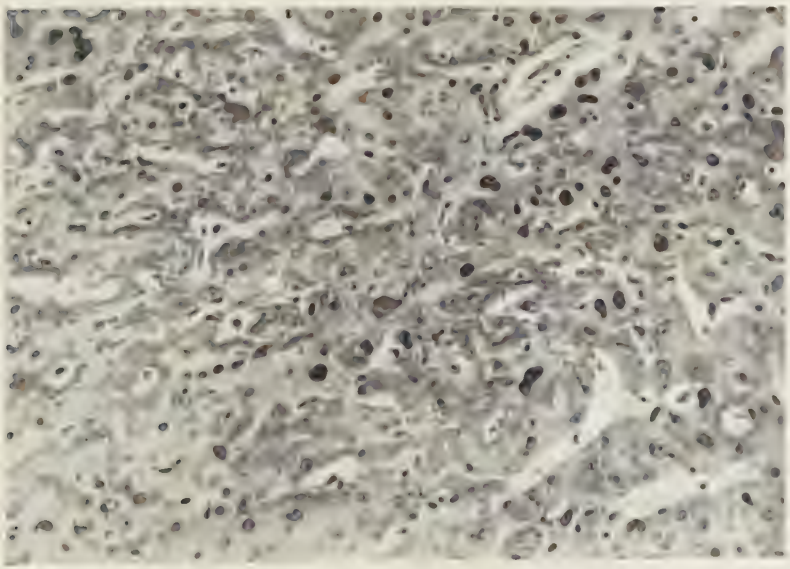


**PHOTO 24. — Amyloïdose hépatique**

C'est la substance amyloïdique qui présente la plus grande basophilie. En bas et à droite, travées hépatiques subnormales mais ne contenant plus de corps de Berg, les granulations cytoplasmiques visibles ne sont que pigmentaires. Remarquer les trois nucléoles vacuolaires centraux. (Giemsa acétique.)

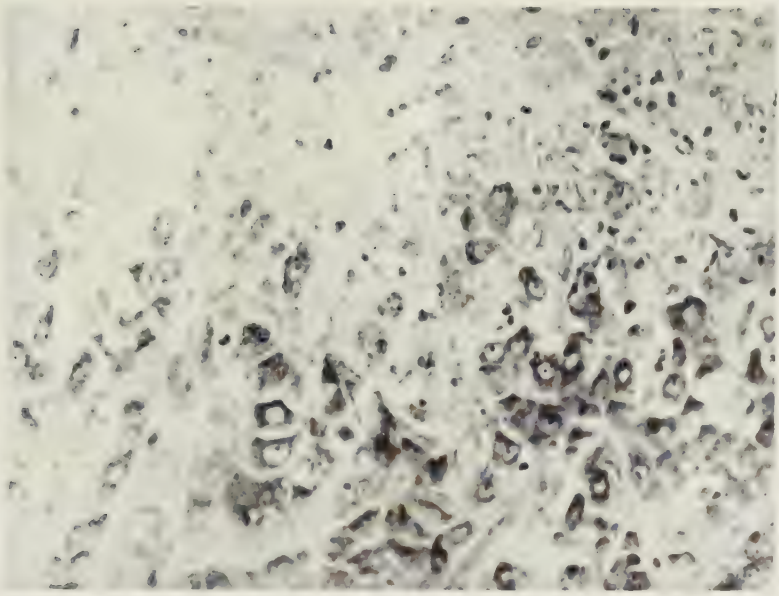


**PHOTO 25. — Hépatite épidémique**

En haut, zone centrolobulaire à cellules en nécrose acidophiles. Au-dessous travées cellulaires vivantes mais accusant des perturbations métaboliques nucléoprotéiques par de fortes anomalies nucléaires. Quelques-unes de ces cellules, à forte charge cytoplasmique en blocs de Berg, sont en intense synthèse protéique. (Giemsa acétique.)

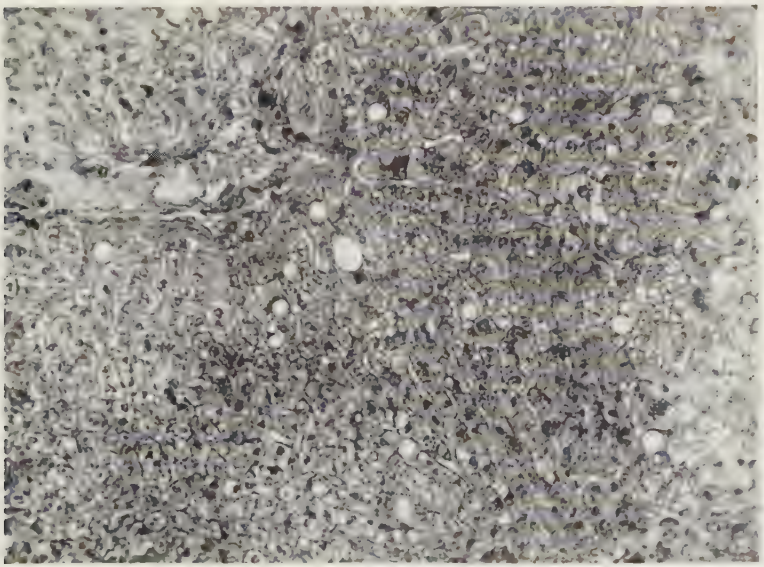


**PHOTO 26. — Hépatite phalloïdienne**

Pauvreté relative des cellules hépatiques centrolobulaires en corps de Berg, ceux-ci sont disséminés dans tout le cytoplasme. En avant de l'espace porte en haut, îlot parenchymateux à basophilie conservée, celle-ci diminue peu à peu en s'approchant de la veine centrolobulaire (en bas et à droite) entourée de cellules en nécrose. (Giemsa acétique).

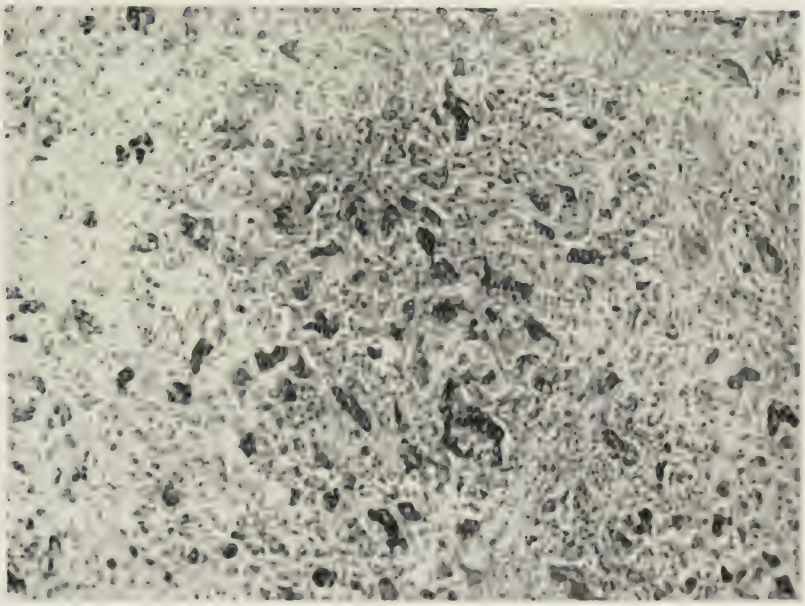


**PHOTO 27. — Ictère grave : Sclérohépatite disloquante**

Quelques îlots cellulaires parenchymateux noyés dans une fibrose jeune. Ces îlots sont constitués de cellules hépatiques à énormes charges cytoplasmiques ribonucléique et contrastant avec le tissu fibreux franchement acidophile. A droite néocanalicules biliaires fortement basophiles. (Giemsa acétique.)

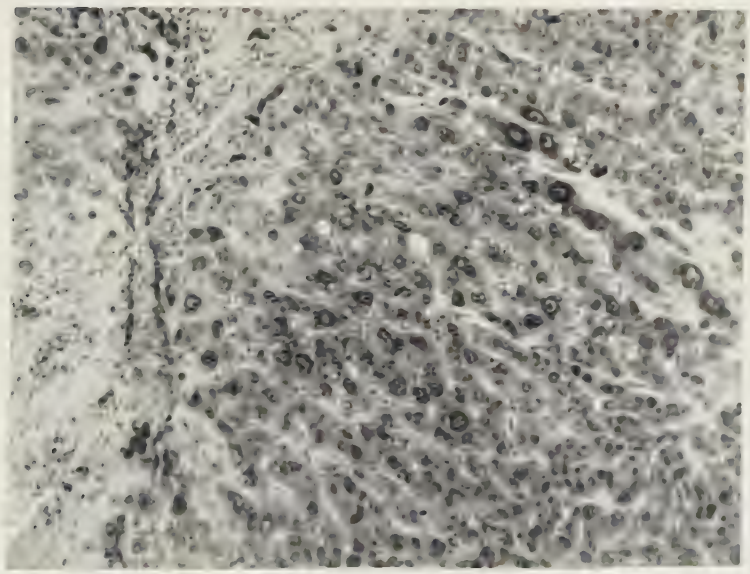


**PHOTO 28. — Cirrhose de Laënnec**

Anisocaryose, charge basophile cytoplasmique élevée. Noter les énormes cellules hépatiques à gros noyaux contenant une très forte concentration de blocs de Berg périnucléaires. (Giemsa acétique.)

Nous pouvons distinguer dans ces anomalies deux grands groupes :

— les anomalies portant sur le nombre, la taille et la forme des nucléoles;

— les anomalies portant sur le contenu des nucléoles.

a) Anomalies de nombre, de taille et de forme.

Ces anomalies nous ont souvent frappé à l'examen d'hépatites infectieuses ou toxiques.

— On voit souvent, dans certaines hépatites, *un nombre considérable de nucléoles par noyau.* Nous avons mentionné dans les foies normaux une moyenne nucléolaire de 1,8 à 3; or ici ce nombre peut être porté à 6, 7 ou 8 et même nous avons pu compter 12 nucléoles dans un noyau géant d'intoxication phalloïdienne. Cette multiplication des nucléoles a été aussi mentionnée par Lagerstedt (1949), dans le jeûne protéique, par Stowell et Lee (1950), etc...

L'origine de cette multiplication nucléolaire est difficile à expliquer, s'agit-il d'une multiplication des nucléoles préexistants par fragmentation, ou bien du bourgeonnement multiple d'un seul nucléole, ou bien encore par néoformation à partir de l'hétérochromatine?

— D'après les figures que nous avons observées, nous penchons pour la deuxième hypothèse. En effet, nous avons pu voir des anomalies morphologiques nucléolaires qui peuvent être interprêtées comme le processus originel de cette multiplication; alors que normalement le nucléole est sphérique nous avons pu en observer en forme de croissant, de banane ou de sablier avec souvent de petits bourgeons appendus sur une ou plusieurs de ses faces comme les variations de la mise au point pouvaient nous le montrer.

— Enfin, nous avons observé des nucléoles de taille parfois énorme contrastant avec la petitesse des autres nucléoles du même noyau. Cette *anisonucléose* se voit surtout dans les hépatites infectieuses ou toxiques et comme toutes les autres

anomalies nucléolaires précitées traduit, pour nous, un trouble du métabolisme des N. P. nucléaires.

b) Anomalies portant sur le contenu des nucléoles: les « nucléoles vacuolaires ».

Les nucléoles vacuolaires sont un des aspects particulier de la question et par leur importance nous retiendrons plus longtemps.

Nous nommons ainsi ces formations nucléaires qui ont reçu des noms fort variés suivant les auteurs et que l'on observe si souvent dans les foies humains.

Il semble que si les histologistes qui se sont occupés des vacuoles intranucléaires n'ont pu résoudre leur cytogénèse, c'est qu'ils ne sont pas remontés à la source même du problème: le nucléole, qui est pour nous le *primum movens* du phénomène, aussi proposons-nous le nom de « nucléoles vacuolaires » pour les désigner, terme qui a le mérite de traduire cette genèse.

HISTORIQUE.

Ces vacuoles intranucléaires, sur lesquelles de nombreux auteurs se penchent depuis peu, sont pourtant connues depuis longtemps puisque Erhlich en 1883 les décrivit le premier dans le diabète, mais il ne vit pas qu'il s'agissait de noyaux et c'est Meixner, en 1906, qui indiqua leur origine nucléaire. En fait, elles furent aussi décrites en 1899 par Almeida sous le nom de « noyau graisseux ». Revues par Councilmann, Mallory et Pearce en 1900 dans la diphtérie et par Askanazy et Huebschmann en 1907 dans le diabète elles sont depuis lors nommées « noyau à glycogène ».

Observées par la suite par Browitz (in Prenant 1904), Karamitzas (1908), Berg (1934), Rathery (1936), Walthard (1938) et Warren (1938), Krarup et Iversen (1940), Joslin (1947), Eger et Klarner (1947), de Brux et Marchand (1949), Lamotte et Lamotte-Barrillon (1952), Camain (1952) et d'autres auteurs, leur première étude cytologique complète est due à Chipps et Duff (1942).

Cazal (1949) les signale comme un signe histologique d'hépa-

tite banale et réversible; puis Cazal et Mirouze (1950) observent leur présence dans certains diabètes humains et proposent le nom de « noyau vacuolaire ». Zimmerman et coll. (1950), confirment ces résultats.

Martin et coll. (1952), les ont observé dans les ictères par hépatite et les ont nommé « nucléoles hydropiques ».

Tout récemment Cazal et Mirouze ont repris l'étude cytologique de ces formations et en ont déduit une interprétation physiopathologique (1951).

Ces anomalies nucléaires n'ont rien de spécifique car les auteurs précités les ont décrites dans les affections les plus variées et même sur des foies par ailleurs tout à fait normaux. Elles ont reçu de la part des histologistes les noms les plus divers: noyau à glycogène, noyau vacuolisé, noyau vacuolaire, nucléole hydropique...

### Morphologie.

A un examen superficiel ces vacuoles nucléaires ont été décrites par les histologistes, comme sphériques ou ellipsoïdales, parfois petites, parfois énormes et vésiculaires, pouvant occuper tout le volume nucléaire avec toutes les tailles intermédiaires; elles peuvent être centrales ou périphériques, unique ou multiples mais leur intérieur paraît toujours optiquement vide.

Leur disposition est le plus souvent périlobulaire mais, quand elles sont en grand nombre, on peut les rencontrer dans les différentes zones du lobule hépatique.

*Ces descriptions ont le tort de ne s'appliquer qu'à un stade de ces formations*, le seul qui soit visible à un examen superficiel et rapide car ainsi que nous allons le voir la cytogénèse de ces vacuoles permet d'apercevoir un autre aspect morphologique.

### Travaux histochimiques personnels

Les études histochimiques antérieures concernant ces formations sont toutes incomplètes et parcellaires, tout au plus depuis Ehrlich avait-on décelé dans ces formations, d'une façon d'ail-

leurs inconstante, quelques granulations glycogéniques, et Berg en outre, y avait décelé du fer, des granulations graisseuses et des pigments.

### 1. *Cytogénèse des nucléoles vacuolaires*

Pour résoudre la cytogénèse de ces vacuoles, les colorations à l'hématéine-éosine et au Feulgen ne sont d'aucun secours. Il faut s'adresser à des colorants détectant les 2 oses spécifiques par une coloration contrastée : type le Giemsa acétique ou la réaction de Brachet.

Prenons comme exemple la coloration au vert de méthyle pyronine, et voyons l'évolution du processus. (Planche 1.)

*L'origine de ces vacuoles est indiscutablement nucléolaire.*

— On aperçoit *à l'intérieur d'un ou de plusieurs nucléoles d'un même noyau une minuscule cavité optiquement vide,* qui grossit peu à peu aux dépens de l'A. R. N. nucléolaire. Celui-ci qui forme au début un anneau régulier s'amincit peu à peu tandis que la chromatine associée au nucléole, qui au début du processus se présentait sous forme de petits corpuscules, s'épaissit parallèlement et finit par engainer complètement le nucléole.

Cet A. R. N. continue à s'amenuiser, et ne forme plus qu'un fin anneau entourant une vacuole centrale; la taille du nucléole pendant toute la durée du phénomène est restée à peu près la même, ce n'est que fort rarement que l'on peut découvrir d'énormes formations telles que le représente la figure 5 de la planche II.

Au stade terminal ces nucléoles vacuolaires présentent un aspect tout à fait caractéristique: en cocarde; la vacuole centrale est entourée par un double anneau: ribonucléique interne et désoxyribonucléique externe.

L'acide ribonucléique nucléolaire va finir par disparaître, il s'amincit le plus souvent sur un seul hémisphère; on trouve des aspects en croissant, en calotte avec parfois de fins filaments ribonucléiques intravacuolaires.

— Mais tout peut s'arrêter là, ou bien l'évolution continuant on entre dans *une deuxième phase.*

Dans ce deuxième stade, qui est celui décrit par les auteurs antérieurs, la vacuole ne contient plus d'A. R. N. et à ce stade il est évident qu'on ne puisse en induire son origine nucléolaire.

La vésicule va grossir, elle n'est plus limitée extérieurement que par un anneau complet de D. N. P., elle peut s'agrandir et atteindre un volume tel qu'un examen rapide, sur les préparations colorées à l'hématéine éosine, pourrait la faire prendre pour une goutte graisseuse intra-cytoplasmique. Cependant un examen attentif permet de déceler entre les deux sphères concentriques de chromatine les autres nucléoles persistants qui, déformés par les pressions qu'ils subissent de la part de la vacuole centrale, prennent des formes en banane, en calotte ou en croissant de lune.

— Ainsi décrite, cette *cytogénèse permet de distinguer deux phases distinctes :*

— *Un premier stade,* dont les rapports indiscutables avec l'A. R. N. nucléolaire nous permettent de l'appeler: *stade ribonucléique;*

— *Un deuxième stade* dont les rapports avec les D. N. P. nous incitent à l'appeler: *stade désoxyribonucléique.*

Ainsi comprise, cette cytogénèse nous apporte la preuve de l'origine purement nucléolaire du phénomène, aussi proposons-nous d'appeler ces formations: *nucléoles vacuolaires,* car cette dénomination a le mérite d'indiquer le primum movens du processus.

— Examinons ce que devient le cytoplasme tout au cours de cette évolution. Il ne présente pas de variation marquée quant à sa charge en R. N. P.; les corps de Berg sont cependant moins souvent périnucléaires, plus petits et plus condensés et prédominent dans la partie moyenne ou périphérique du cytoplasme.

— Tel est donc le schéma général de cette cytogénèse que l'on peut considérer comme la cytogénèse type. Mais *il y a de nombreuses modalités que nous citerons brièvement.* Ces variations concernent les deux stades. (Planche I.)

*Stade I :*

— La cavité nucléolaire primitive peut être double, triple ou multiple (nous en avons compté jusqu'à 12 dans le même nucléole réalisant un aspect spumeux nucléolaire très caractéristique), la vacuole provenant en fin de compte de la fusion de ces multiples cavités par dissolution de l'A. R. N.

— La disparition de l'A. R. N. peut se faire plus irrégulièrement si bien que l'on aperçoit des formes en trèfle, en trident. Elle peut aussi disparaître de la périphérie en persistant sous forme d'un pont central unissant les deux faces de l'anneau D. N. P., ce qui traduit une origine nucléolaire bicavitaire.

— Ces formations peuvent apparaître en même temps dans plusieurs nucléoles d'un même noyau: nous avons vu jusqu'à 5 nucléoles vacuolaires au premier stade dans un même noyau.

— La forme de ces vacuoles, le plus souvent sphérique, peut être cependant très variée: en banane, bourgeonnante, comme le montre les variations de la mise au point.

*Stade II :*

— Nous avons vu que toutes *les tailles* sont possibles de la grosseur d'un nucléole à celle du noyau lui-même.

— *Leur nombre* par noyau, le plus souvent unitaire, peut être quelquefois multiple, et nous en avons rencontré jusqu'à 5 dans un même noyau hypertrophié.

— *Leur forme*, le plus souvent sphérique, peut être très variée, ellipsoïdale, en sablier ou ramifiée, ce qui nous incite à leur attribuer dans ce cas une origine multiple provenant de la fusion de plusieurs petites vacuoles préexistantes.

Signalons enfin les nucléoles vacuolaires aux tailles gigantesques dont le contenu refoule les deux membranes concentriques de chromatine qui se présentent avec un aspect fripé et que Cazal et Mirouze ont baptisé « aspeçt dégonflé ». Cette forme n'est pas due semble-t-il à la fuite du contenu central mais n'est que le résultat de pressions mécaniques cytoplasmiques

car on la rencontre souvent dans les cellules à forte surcharge protoplasmique: diabète et polycorie où ces formations peuvent prendre des aspects très variés: anfractueux, invaginés, étoilés...

2. *Destinée et devenir des nucléoles vacuolaires*

Il faut remarquer tout de suite que le deuxième stade n'est pas l'aboutissement inéluctable du premier, le processus une fois déclenché ne doit pas obligatoirement aboutir à la vésicule énorme intranucléaire qui serait le but de cette évolution.

Le fait que dans certains prélèvements on ne trouve que des stades R. N. P. et dans d'autres des stades D. N. P., nous incite à penser *qu'ils sont la traduction de deux mécanismes physiologiques différents;* car rares sont, en effet, les prélèvements où l'on rencontre tous les intermédiaires entre ces deux stades.

Nous croyons que la destinée de ces nucléoles vacuolaires n'est pas identique pour toutes ces formations, mais si la cytogénèse est facile à saisir, par les multiples formes intermédiaires rencontrées, le processus inverse est malheureusement hypothétique parce qu'il est difficile de hiérarchiser tous ces stades dans le temps et qu'il est possible de les considérer aussi bien comme des étapes de « régression » que comme des étapes de « progression ».

Il nous semble cependant que *la destinée de ces formations est double* et dépend de leur charge en A. R. N.

— Tant que les nucléoles sont conservés tout est réversible car toutes les potentialités nucléolaires de synthèse ribonucléique sont conservées.

— Mais le deuxième stade est un stade dont le métabolisme est déjà « pathologique »: un nucléole a disparu et si le noyau est toujours vivant, comme le montre la persistance des autres nucléoles, sa charge ribonucléique a diminué et les processus métaboliques intranucléaires sont perturbés.

De tout ceci il résulte que la formation tout comme la régression de ces nucléoles vacuolaires doit être très rapide.

Nous avons cependant vu des figures qui semblent prouver

que l'évolution des nucléoles vacuolaires peut se faire dans plusieurs sens.

— Au stade ribonucléique rien ne permet de rejeter l'idée que les nucléoles vacuolaires suivent, pour régresser, un processus inverse à celui suivi pour leur formation, bien que nous n'ayons pas de preuve cytologique sûre.

— Au stade désoxyribonucléique nous avons saisi quelques images qui nous permettent d'affirmer deux évolutions possibles :

— Une évolution mortelle par éclatement de la vésicule nucléaire à son stade ultime de bulle géante; les nucléoles sont dans ce cas absents, il ne persiste qu'une fine membrane désoxyribonucléique hémisphérique;

— Une évolution régressive par expulsion du contenu vacuolaire qui peut s'effectuer de deux manières:

« Soit à travers la membrane nucléaire conservée; ce processus est donc comparable à un phénomène osmotique, et il nous est prouvé par cette aréole claire, coiffée par un noyau invaginé, si celui-ci se vide sur une seule face, ou formant une auréole périnucléaire complète si l'évacuation a lieu sur toutes les faces à la fois. » (Photo 17.)

« Soit par ouverture directe de la vacuole dans le cytoplasme par un minuscule pertuis qu'il est difficile de saisir puisqu'il faut en effet que la coupe passe exactement à son niveau. » (Photo 16.)

Le noyau doit probablement ensuite reprendre sa forme normale par dispersion de la membrane chromatique interne.

Cette phase de régression doit être rapide et synchrone pour tous les noyaux, car on ne retrouve pas ces vacuoles nucléaires sur les prélèvements faits à quelques jours d'intervalle après des traitements divers, et Cazal et Mirouze ont vu les « noyaux vacuolaires » d'un foie de diabétique disparaître brutalement lors d'un coma insulinique.

PLANCHE I

## CYTOGENESE DES NUCLEOLES VACUOLAIRES DE LA CELLULE HEPATIQUE HUMAINE

— Coloration vert de méthyle pyronine ; en vert : désoxyriconucléoprotéines ; en rouge : ribonucléoprotéines.

— Noyaux isolés de cellules hépatiques.

— L'évolution du processus suit la numérotation des figures et a lieu uniquement dans le nucléole supérieur de chaque noyau.

— **Figure 1.** — Noyau normal à 2 nucléoles.

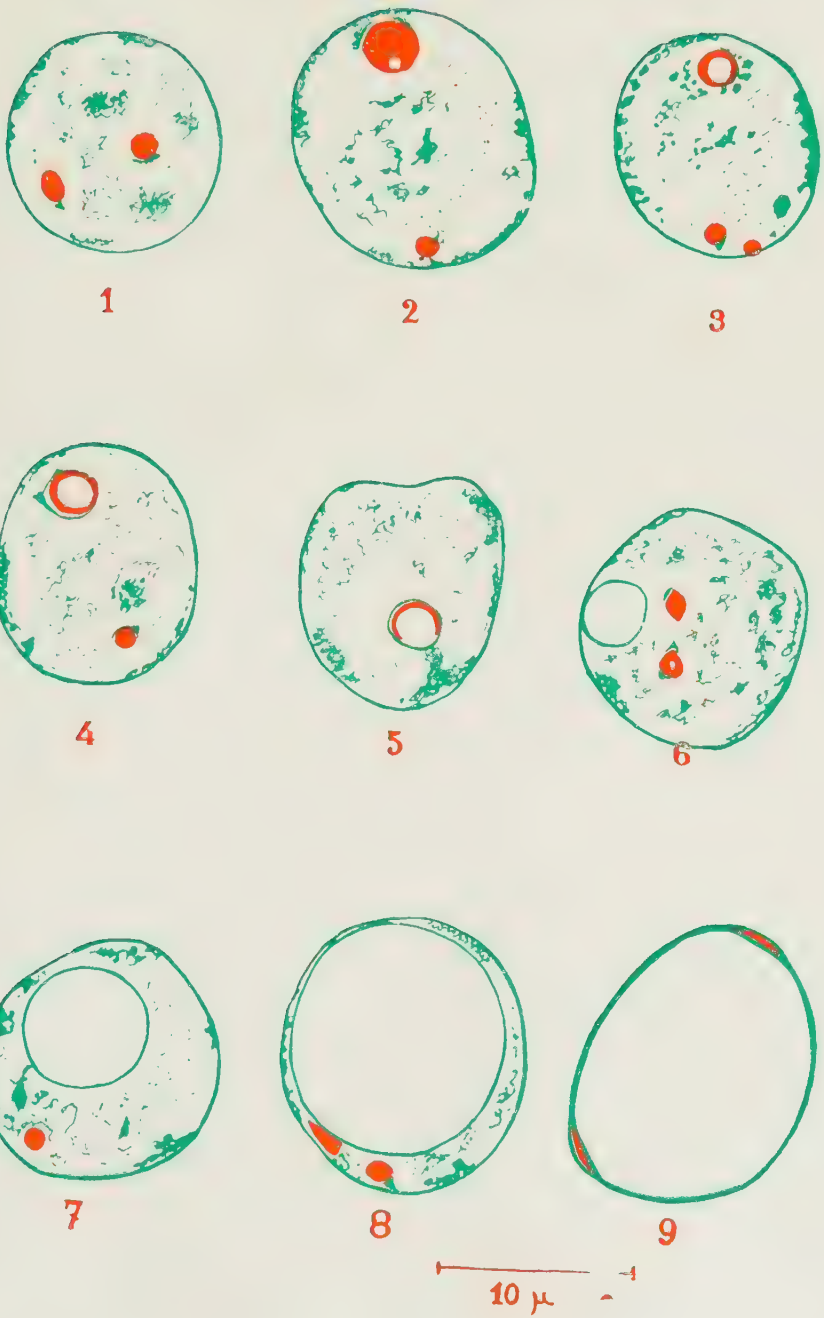
— **Figure 2, 3, 4, 5.** — Premier stade ribonucléique avec tous les stades intermédiaires.

— **Figures 6, 7, 8, 9.** — Deuxième stade desoxyribonucléique avec tous les stades intermédiaires.

Toutes ces figures proviennent d'un cas d'intoxication phalloïdienne.

Remarquer le nombre variable de nucléoles par noyau.

Explications complémentaires dans le texte.


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10 μ

3. *Contenu cytochimique des nucléoles vacuolaires*

Ces premiers résultats nous ont incité à poursuivre ces recherches pour essayer de déterminer le contenu de ces vacuoles.

Nous avons dit que la vacuole paraît optiquement vide à tous les stades de sa formation et après les fixations les plus variées (alcoolique, aqueuse, acétonique...) et colorée par les méthodes usuelles. Cependant dans quelques cas, il est possible de voir à l'intérieur de ces vacuoles colorées par l'hématéine-éosine un fin granité éosinophile, après fixation alcoolique exclusivement.

Nous avons donc effectué sur des prélèvements, fixés dans des liquides adéquats aux réactions envisagées, les réactions cytochimiques qui nous paraissaient intéressantes.

— Nos résultats se soldent par un *bilan relativement négatif;* en effet, ces vacuoles ne contiennent:

— ni lipase, ni esterase;
— ni phosphatase acide;
— ni phosphatase alcaline;
— ni oses nucléiques (Feulgen négatif, Turchini négatif);
— ni bases puriques: murexide négatif;
— ni phosphore nucléique: test de Serra et Queiros-Lopez négatif;
— ni fer: Perls négatif;
— ni protéines, ni constituants protéiques (acides aminés).

— Les méthodes de détection du *glycogène* peuvent parfois mettre en évidence, mais d'une façon très inconstante, la présence de quelques granulations de glycogène dans certains de ces nucléoles, mais seulement au deuxième stade, nous n'en avons jamais vu dans les nucléoles vacuolaires au premier stade.

Ce glycogène intravacuolaire se présente le plus souvent sous forme de grains, de mottes, disséminés ça et là dans le liquide vacuolaire, mais là n'est pas, croyons-nous, sa position initiale.

Il nous a en effet été possible de voir, sur de rares échan-

tillons, l'origine topographique de ce glycogène: il est synthétisé aux dépens, ou du moins, contre la membrane chromatinienne périphérique et apparaît sous forme d'un anneau ou d'un croissant interne appliqué contre cette membrane, ce n'est qu'ensuite qu'il est déplacé et se résout en granules qui flottent dans le liquide vacuolaire dans lequel il paraît être insoluble. La synthèse de ce glycogène n'est donc effectuée que sur la face interne de l'enveloppe, ce qui ne nous surprend pas car seule cette membrane possède des enzymes et contient des phosphates indispensables à la synthèse du glycogène, sans préjuger de la nature de l'ose initial glycogéno-formateur.

Parfois, mais très rarement, ce glycogène peut occuper et remplir toute la vacuole et se décèle de ce fait au carmin de Best sous forme d'une flaque rouge remplissant toute la vésicule.

— De plus, nous avons aussi, mais rarement, pu déceler à l'intérieur de ces vacuoles sur des prélèvements fixés à cet effet de fines granulations graisseuses qui se sont montrées constituées, avec les colorations histochimiques spécifiques, de *phospholipines*.

— *En résumé*, ces vacuoles nucléolaires contiennent, mais d'une manière inconstante, du glycogène, en granules ou en flaques, et parfois aussi des gouttelettes phospholipiniques, en suspension dans un liquide dont la nature chimique n'a pu être déterminée.

### Cytologie comparée et discussion

En parcourant la littérature, nous avons trouvé des descriptions comparables à la nôtre concernant des formations intranucléaires identiques.

— Nous ne croyons pas déborder trop largement du sujet envisagé, en mentionnant ces travaux concernant la plupart du temps des *organismes animaux* les plus variés, car ils ont le mérite de mettre en évidence la fonction sécrétrice et l'activité nucléolaires.

Les premières vacuoles intranucléolaires furent décrites pour

la première fois en 1895 par Ranson chez les poissons osseux. Almeida, en 1899, mentionna des vacuoles juxtanucléolaires dans des cellules graisseuses.

Sack en 1895, décrivit dans les noyaux des cellules adipeuses des vacuoles sphriques ou ellipsoïdales, rares chez le fœtus et le vieillard, en relation avec la formation de la graisse, car elles se coloraient en noir par l'acide osmique.

Vigier en 1900 décrit dans la glande à venin du triton des figures identiques à celles que décrivit Phisalix (1900) sur la glande à venin de la salamandre, concernant les vacuoles intranucléaires d'origine nucléolaire à contenu homogène pouvant être expulsé dans le cytoplasme à travers un pertuis de la membrane (sa figure 14, Pl. I, ressemble d'une façon frappante à notre photo n° 16) ou par osmose à travers une membrane nucléaire intacte.

Chez l'homme, de très nombreuses formations intranucléaires ont été décrites dans les organes les plus divers: Cavallero (1947), en mentionne dans les cellules de l'antéhypophyse dont l'origine nucléolaire paraît indiscutable; elles contiennent aussi du glycogène et se vident dans le cytoplasme.

— Enfin, tout récemment, Stich (1951), décrit des formations nucléolaires identiques chez l'algue *Acétabularia* dont il ne peut préciser la nature car toutes les réactions histo-chimiques qu'il a effectuées se sont révélées négatives. Il a cependant pu observer sur le vivant l'élimination de leur contenu dans le suc nucléaire.

— Pour en revenir aux *formations nucléaires hépatiques humaines,* signalons qu'Askanazy et Huebschmann nient l'origine nucléolaire de ces formations.

Berg, en 1934, décela aussi dans ces mêmes vacuoles, non seulement du glycogène mais des pigments, des graisses et du fer; il leur attribue une origine nucléolaire qu'il illustre par des figures très démonstratives. Ces formations s'ouvrent dans le cytoplasme et leur membrane se dégonfle, bien qu'un deuxième mécanisme de vidange sans effraction de la membrane nucléaire soit aussi possible, ce qui est tout à fait en accord avec nos observations. Mais il ne prouve pas l'origine nucléolaire

de ces formations, la coloration à l'hématoxyline qu'il emploie ne le lui permet pas.

Martin et coll. (1952) ont aussi suspecté cette origine nucléolaire, d'où le nom de « nucléoles hydropiques » qu'ils attribuent à ces formations, mais eux aussi n'en apportent pas la preuve.

— Mis à part la détection histochimique du glycogène, décrite par tous les auteurs qui se sont intéressés à la question, il n'y a à notre connaissance que les travaux histochimiques récents de Cazal et Mirouze qui se rapportent à ces vacuoles nucléaires. En s'appuyant sur la seule coloration de Feulgen ces auteurs ont établi que « les parties nobles du noyau ne participent pas à la formation de la vacuole »; ni la chromatine, ni les nucléoles n'interviendraient dans le processus. Sans vouloir insister sur la contradiction formelle à laquelle ils aboutissent puisqu'ils écrivent plus loin: « que les vacuoles intranucléaires ne peuvent se développer qu'à partir des nucléoprotéines », nous avons pu montrer que le *nucléole est le primum movens du phénomène,* le Feugen ne détectant que le désoxyribose étant insuffisant pour résoudre le problème, et la persistance de nucléoles autour de la vacuole n'étant pas une preuve suffisante de l'indépendance nucléolo-vacuolaire du processus car le nombre de nucléoles n'est pas une constante nucléaire.

Ces auteurs pensent aussi qu'à côté du glycogène, les vacuoles contiennent des substances solubles dans les fixateurs aqueux et alcooliques (glucides simples, pentoses, acide phosphorique, acide urique,...) substances intermédiaires dans le métabolisme des N. P. Or, l'histochimie démontre que ces noyaux sont vides aussi bien après fixation aqueuse qu'alcoolique ou acétonique. Par ailleurs, si c'est un fixateur aqueux qui a dissout ces substances hydrosolubles, on ne voit pas pourquoi le glycogène, hydrosoluble aussi, ne se serait pas dissout et pourquoi avec un fixateur alcoolique on ne les retrouverait pas à côté du glycogène à l'intérieur de ces vacuoles. De deux choses l'une: ou ces composés intermédiaires sont solubles dans l'eau et l'histochimie ne doit rien révéler, pas même le glycogène, ou bien ils sont insolubles et on doit les retrouver à

côté du glycogène, après fixation alcoolique. Or, il n'en est rien, *le glycogène et les phospholipides sont les seuls constituants concrétisés, très inconstants d'ailleurs, des nucléoles vacuolaires qui contiennent un liquide dont nous n'avons pu déterminer la nature.* Quant à la régression de ces formations mentionnée par ces auteurs sous forme d'un fin feutrage intravacuolaire, ce n'est qu'une erreur d'optique due à la présence de glycogène visible sur les coupes colorées à l'hématéine-éosine sous forme d'un fin piqueté éosinophile.

CONCLUSIONS.

Les études histochimiques que nous avons effectuées sur les formations intranucléaires des C. H. décrites par de nombreux auteurs sous les noms divers de noyaux graisseux, noyaux à glycogène, noyaux vacuolaires, noyaux vacuolisés, nucléoles hydropiques..., nous ont montré:

— *que leur cytogénèse s'effectuait à partir d'un nucléole* d'où le nom de *nucléole vacuolaire,* que nous proposons pour remplacer les dénominations antérieures, disparates et peu précises;

— *que cette cytogénèse s'effectuait en deux stades successifs* sans que le second soit l'aboutissement obligatoire du premier.

  — en raison de ses relations avec l'A. R. N., nous avons nommé le premier stade: stade ribonucléique;

  — tandis que nous avons donné au deuxième stade le nom de stade désoxyribonucléique en considérant ses relations avec l'A. D. N.

— *que la destinée de ces formations est différente avec le stade envisagé :*

  — la destinée du premier stade ne peut être résolue qu'en se basant sur des analogies;

  — le deuxième stade peut aboutir à une évolution mortelle par éclatement de la vésicule, ou à une évolution régressive par vidange du contenu de celle-ci à l'intérieur du cytoplasme par deux mécanismes différents.

— *que le contenu de ces nucléoles vacuolaires* est probablement un liquide dans lequel on ne peut déceler, d'une façon très inconstante d'ailleurs, que quelques granulations phospholipiniques et glycogéniques, celles-ci probablement synthétisées au niveau de l'interface anneau-chromatinien-liquide intranucléolaire.

3) *Mitoses atypiques.*

Il n'y a pas d'étude d'ensemble sur les mitoses atypiques des C. H. du foie humain; ces anomalies sont pourtant assez fréquentes et on les rencontre souvent dans la pathologie hépatique.

Nous allons essayer de schématiser le plus possible ces anomalies mitotiques.

Elles sont de deux ordres .

a) *Trouble du rythme des cinèses .*

Nous avons vu que les mitoses sont rarissimes dans les foies normaux, il n'en est pas de même dans certains prélèvements qui présentent un pourcentage élevé de cellules en mitose.

— Il est évident que l'on ne peut considérer comme un trouble cinétique les nombreuses mitoses d'un foie présentant par ailleurs des lésions nécrotiques disséminées ou localisées, comme dans les cas d'hépatites épidémiques ou d'hépatites toxiques; les mitoses dans ce cas ne sont que l'expression d'un processus de régénération.

— Mais nous n'avons en vue que les cas où le parenchyme ne présente pas de lésions telles qu'un remplacement de cellules fonctionnellement inactives s'impose; c'est le cas par exemple de la mononucléose infectieuse, dans laquelle l'index mitotique du tissu hépatique fonctionnellement et histologiquement normal est très élevé.

b) *Troubles du déroulement de la mitose .*

Les classifications de ces troubles sont fort nombreuses et

très disparates; quant aux mécanismes qui président à leur genèse, ils sont fort discutés.

— *Ces troubles aboutissent* souvent à la formation de pycnoses, de cellules binucléées et parfois de noyaux géants, ou polyploïdes.

Le mécanisme de la formation de ces noyaux géants est des plus controversé. Pfuhl (1938) attribuait leur cytogénèse à la fusion nucléaire; Stough (1931-35) à une pseudo-amitose comme le soutint aussi Lewis (1945); Belar à un faux étranglement nucléaire.

Tondury (1947) et Seintein (1949) et Wilson et Leduc (1950) décrivent des anomalies ana-télophasique de la mitose par pont chromatique à l'anaphase sans plasmodiérèse concomitante aboutissant à des noyaux fissurés.

Quant à la polyploïdie, Clara (1930), l'explique par une division interne qu'il appelle « endomitose » ou « endoamitose ». Heidenhain soutient aussi ce point de vue et Wilson et Leduc (1948) l'attribuent à des métaphases « endomitotiques » sans disparition de la membrane nucléaire.

D'après de nombreux auteurs, cette polyploïdie se ferait avec une augmentation concomitante du volume nucléaire, ce que Jacobj a énoncé sous la forme de la loi de redoublement volumétrique: « l'accroissement des volumes nucléaires se ferait en progression géométrique ».

Cependant il faut être prudent dans cette interprétation, comme le fait remarquer Bieselee (1944); chez le rat les noyaux hépatiques doublent de taille de la naissance à l'âge adulte, mais le nombre de chromosomes reste identique. Nous avons également observé cette différence de taille physiologique entre les noyaux des C. H. infantiles et ceux des C. H. d'adultes.

De cette discussion, il semble que l'on puisse conclure que toutes ces formations: noyaux géants, cellules multinuclées..., sont la conséquence d'une perturbation mitotique.

— Nous avons en effet observé personnellement et très souvent dans des foies pathologiques d'étiologie les plus diverses, mais surtout dans les hépatites infectieuses et toxiques et au

voisinage de métastases hépatiques, des *anomalies flagrantes de la mitose* que nous pouvons très schématiquement classer sous deux rubriques :

1. *Les hémicinèses ou mérostathmocinèses* caractérisées par des translations chromosomiques et accompagnées d'anomalies de répartition.

Elles sont surtout visibles au niveau des ana-, des télo- et des métaphases; quant aux anomalies de la prémétaphase, il est difficile de dire si elles existent.

— Dans les métaphases on voit souvent en effet des chromosomes aberrants, il y a dispersion chromosomique. Ces images peuvent aboutir soit à une pycnose généralisée, soit à des pseudo-métaphases stathmocinétiques avec chromosomes en précession anaphasique aboutissant à des images de pseudo-mitose pluripolaire, et à des cellules plurinuclées avec anisocaryose nette. Les noyaux fils doivent avoir un stock chromosomique différent par l'inégale répartition des chromosomes. (Photo 18.)

Dans ce cas le fuseau manque en général.

— Dans les anaphases de mitose bipolaire, on peut voir des chromosomes en retard réalisant un pont de chromatine entre les deux lots de chromosomes (photo 19), si bien que l'on aboutit en fin de compte, quand les membranes nucléaires sont reformées, à des images considérées comme des stades d'amitose et qui en fait ne sont que des anomalies mitotiques. Dans ces cas il n'y a jamais de plasmodiérèse concomitante.

— Dans les télophases enfin, les noyaux fils restent en contact, on aboutit à la formation de noyaux scissurés qui ne sont aussi que des noyaux pseudo-amitotiques sans plasmodiérèse concomitante. Nous avons vu de ces noyaux scissurés, incisés, « ou fissurés » de Wilson et Leduc (1948) en prophase, ils doivent donc persister à ce stade jusqu'à la mitose suivante ce qui confirme les vues antérieures de Clara (1931). (Photo 20.)

Ces anomalies télophasiques peuvent être qualifiées de stathmotélophases.

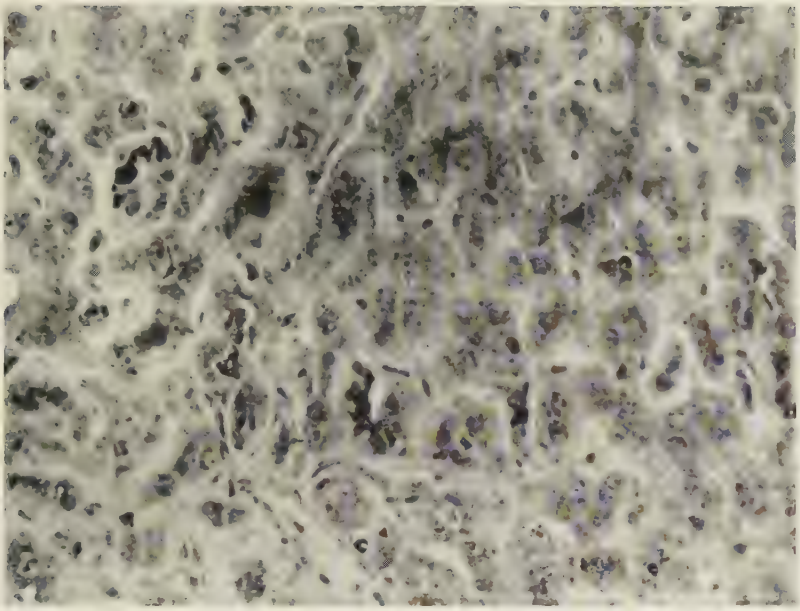


**PHOTO 29. — Ictère par rétention avec cirrhose biliaire débutante**

Les cellules hépatiques intactes ont une charge R. N. P. cytoplasmiques normale. Rares anomalies nucléaires. Les thrombi biliaires sont très visibles sous forme de concrétions de formes variées mais d'un noir homogène. (Giemsa acétique.)

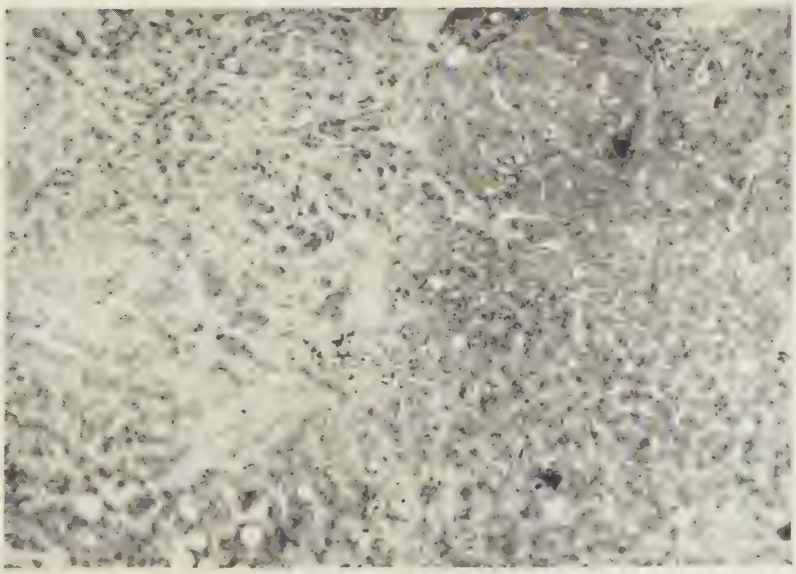


**PHOTO 30. — Métastase hépatique d'un épithélioma du sein**

A gauche, travées épithéliomateuses d'une basophilie faible et homogène. A droite de l'espace porte, cellules hépatiques à charge cytoplasmique normale, au-desuss îlot cellulaire en dégénérescence mais encore basophile. (Giemsa acétique.)

2. Les cas de *tropocinèse*, c'est-à-dire manque de régulation d'orientation du noyau lors de la prophase, sont difficiles à interpréter au niveau du foie et nous n'insisterons pas.

— Quel est *le rôle des A. N. dans ces anomalies?*

Koller, en 1947, émet l'idée que la viscosité des chromosomes en anaphase et la suppression du fuseau sont associées à un excès d'A. N. sur les chromosomes; ce concept d'un manque en A. N. est une explication attrayante de la suppression progressive de l'activité mitotique chez le jeune.

— Rappelons enfin *la présence des phosphatases alcalines et acides* (1) au niveau de ces chromosomes de mitoses atypiques topographies qui concordent constamment avec les localisations d'A. D. N.

— Nous ne nous étendrons pas sur *les mécanismes* qui président à la formation de ces mitoses anormales.

Signalons que les interprétations mito-inductrices les plus diverses ont été proposées: lysoplasie par Fiessinger si ces mitoses sont associées à des dégénérescences cellulaires; action caryoclasique et caryocinétique des toxines phalloïdiennes dans l'hépatite phalloïdienne (Serre et Cazal, 1943); action à distance des substances sécrétées par les cellules cancéreuses dans les métastases diverses (Loubatières, 1950); et enfin, rôles hormonaux possibles dans les cas où ces perturbations mitotiques ne correspondent pas aux trois processus précités (Picard, 1949).

*Conclusions.* — L'observation cytologique de foies pathologiques, nous a permis de décrire quelques perturbations de la mitose analogues à celles que déterminent expérimentalement des agents chimiques antimitotiques et aboutissant à la formation de pycnoses, de noyaux géants, de cellules binuclées, et très probablement aussi à des noyaux polyploïdes.

(1) Voir chapitre premier: « Les phosphatases hépatiques ».

4) *Les surcharges cytoplasmiques,*

a) *Surcharge pigmentaire.*

Ces surcharges sont de constatation fréquente, elles peuvent être diffuses, périportales ou localisées au centre du lobule.

En fait, il faut distinguer deux cas avec l'origine du pigment :

— Le pigment d'origine ferrique jaune-brun mis en évidence par la réaction de Perls;

— Le pigment d'origine biliaire verdâtre ou jaune d'or.

— Dans *l'hémosidérose,* le pigment est le plus souvent diffus: on le trouve à l'intérieur des C. H., dans le tissu conjonctif périportal... (Photo 21.)

La C. H. contient des corps basophiles dans les parties de son cytoplasme libres de pigment, mais si la cellule contient de nombreux pigments ferriques, sa charge en corps basophiles peut être fort diminuée.

Notons la grande richesse de ces cellules en surcharge ferrique, en nucléoles vacuolaires au premier stade: c'est en effet dans un cas d'hémosidérose que nous avons vu avec beaucoup de netteté la cytogénèse de ces formations.

— La présence de petites concentrations de *pigments biliaires* dans la C. H. n'est pas nécessairement associée à une diminution de la basophilie cytoplasmique. Des C. H. contenant en forte proportion de fins granules de bilirubine montrent des corps de Berg diminués en nombre et en taille; les cellules diffusément imprégnées de pigment biliaire ne contiennent plus de corps de Berg.

Les C. H. délimitant les canalicules biliaires contenant des thrombi biliaires présentent un liseré plus basophile que normalement autour de ces capillaires.

Il est assez fréquent de rencontrer dans ces cellules des nucléoles vacuolaires principalement du premier stade.

— Il semble se dégager de l'étude de ces surcharges l'idée

qu'il y a un balancement entre la charge ribonucléique protoplasmique de la cellule et sa richesse en pigment; à mesure que la concentration de celui-ci augmente la concentration en ribonucléoprotéines diminue. Mais ce principe n'est pas toujours exact.

b) *Surcharge glycogénique.*

On la trouve principalement dans deux affections: le diabète et la polycorie glycogénique.

Un examen à faible grossissement d'une coupe de foie d'une de ces affections montre une disparition presque totale de la basophilie cellulaire, la coupe colorée au Giemsa est pâle et on ne distingue plus que les noyaux piquetant de bleu la préparation. (Photo 22.)

A un examen plus approfondi les C. H. présentent un aspect très caractéristique: les R. N. P. cytoplasmiques forment un léger anneau périnucléaire d'où partent ça et là quelques ramifications étoilées entre lesquelles le protoplasme apparaît franchement acidophile; ces zones privées de R. N. P. correspondent à l'accumulation de glycogène. On ne trouve jamais d'aspect comparable à celui de la cellule stéatosique avec ses nombreuses gouttelettes de graisse nettement délimitées par les corps de Berg; ici, à part quelques travées basophiles, le protoplasme ne contient que des zones riches en glycogène.

En résumé, la cellule glycogénique est très pauvre en corps de Berg et ceux-ci lorsqu'ils existent sont minuscules et de topographie périnucléaire constante.

Signalons enfin les déformations nucléaires tout à fait spéciales que l'on trouve dans ces deux affections: sous l'effet mécanique de la compression par les constituants cytoplasmiques en excès, les noyaux prennent les formes les plus diverses et apparaissent polygonaux, invaginés, anfractueux, dentelés, etc...

Ces déformations obéissent à deux mécanismes: elles peuvent être provoquées:

— soit par l'augmentation de la taille nucléaire ou de la taille de la vésicule nucléolaire qui souffle le noyau lequel, comprimé par le glycogène cytoplasmique, se déforme;

— soit par l'augmentation de la concentration cytoplasmique en glycogène, le noyau, de volume normal, est de ce fait comprimé.

Donc, il y a deux origines possibles à ces déformations nucléaires :

— origine « exogène » par augmentation de la charge cytoplasmique ;

— origine « endogène » par augmentation du volume nucléaire sous l'influence de la vésicule nucléolaire qu'il contient.

Rappelons enfin que ce sont dans les cellules en surcharge glycogénique que l'on trouve d'une façon la plus constante des nucléoles vacuolaires au deuxième stade.

La cellule en surcharge glycogénique est parmi les cellules pathologiques, celle qui nous a semblé la moins riche en corps de Berg.

c) *Surcharge graisseuse* (Photo 23).

Dans les C. H. contenant de minuscules gouttes de graisse, les corps de Berg sont très nombreux mais leur volume est très réduit, on ne trouve plus les volumineuses formations enchevêtrées, mais un fin piqueté de corpuscules basophiles formant des auréoles à paroi épaissie autour des gouttes graisseuses. Il n'y a rien d'impossible à ce que ces minuscules gouttelettes correspondent aux cytochondries décrites par Opie en 1946.

Les gouttes graisseuses d'un volume supérieur semblent provenir de la confluence de gouttes plus petites.

Dans les C. H. remplies de nombreuses gouttes de taille moyenne les corps basophiles sont situés entre ces vésicules qu'ils délimitent d'une façon toujours bien régulière, mais leur concentration globale est fortement diminuée.

Enfin, dans les C. H. stéatosiques à grosses gouttes, le cytoplasme actif contenant le noyau aplati ne renferme que de rares blocs de Berg, minuscules, dont la concentration optimum

est périnucléaire, le croissant cytoplasmique opposé au noyau n'est pas basophile.

On peut trouver dans les cellules stéatosiques des nucléoles vacuolaires à tous les stades et nous en avons vu au stade 2 qui déversaient le contenu de leur vacuole dans la goutte graisseuse.

d) *Surcharge amyloïdique.*

Ce n'est pas à proprement parler une surcharge de la C. H. puisque le dépôt de la substance amyloïdique se fait à l'intérieur des sinusoïdes entre les travées hépatiques qu'elle comprime en s'épaississant progressivement.

Sur des coupes colorées au Giemsa l'aspect du foie amyloïdique est très caractéristique: c'est la substance déposée qui présente la plus grande basophilie; les travées hépatiques tout en conservant une basophilie cytoplasmique diffuse ne contiennent plus de corps de Berg. (Photo 24.)

Dans ces cellules les nucléoles vacuolaires sont rares, on en trouve au deuxième stade cependant.

5) *Les dégénérescences.*

Elles s'observent au niveau du cytoplasme exclusivement, dans les cas les plus divers: hépatites, cirrhoses, stase sanguine, etc...

Dans tous ces cas le noyau est morphologiquement et cytochimiquement intact :

— *Dans la dégénérescence aqueuse ou vacuolaire*, caractérisée par l'apparition de vacuoles intracytoplasmiques, le cytoplasme est toujours basophile autour de ces formations, mais cette basophilie est diffuse et les corps de Berg morphologiquement identifiables sont rares. La cellule semble renfermer une concentration ribonucléique bien inférieure aux cellules normales, même lorsque les vacuoles sont petites.

— *La dégénérescence granuleuse* est associée à une disparition presque totale des corps de Berg et le cytoplasme de-

vient franchement acidophile, mais cette acidophilie n'est pas homogène: on distingue sur un fond rose pâle au Giemsa acétique un fin piqueté rouge de répartition homogène dont la constitution protéique n'est pas douteuse.

— *Dans la dégénérescence graisseuse,* la C. H. conserve ses acides ribonucléiques cytoplasmiques tant que le noyau reste intact; nous avons déjà décrit les divers aspects de cette dégénérescence graisseuse. (Photo 23.)

6) *Nécroses.*

On les observe au cours d'hépatites suraiguës. Le phénomène porte d'abord sur le noyau, c'est lui qui semble être atteint électivement, ce n'est que secondairement que le protoplasme présente des altérations.

On observe dans les foies humains tous les modes de dégénérescence classique: pycnose, caryolyse et caryorrhexie.

Pour tous ces modes la modification la plus précoce et commune porte sur la disparition des nucléoles.

— Les noyaux en *pycnose* sont très reconnaissables par leur petite taille, ils sont ratatinés, leur chromatine est compacte et on ne décèle plus de détails intranucléaires. Avec le Giemsa ils prennent une coloration bleu intense diffuse et une apparence laquée. Ils prennent toujours aussi très intensément le Feulgen et le vert de méthyle.

Dans les stades ultérieurs, les colorations ci-dessus indiquées s'affaiblissent tandis que le Feulgen reste positif plus longtemps; cette différence est due à la dépolymérisation de l'A. D. N.

Picard avait déjà noté en 1933 cette disparition nucléolaire pendant la pycnose. Par contre, Meites (1944) n'est pas de cet avis puisqu'il observe la persistance du nucléole pendant la pycnose; notons cependant que ces auteurs travaillaient sur des tissus végétaux.

Les travaux de Leuchtenberger (1950) sur les noyaux hépatiques par les méthodes d'absorption de Pollister ont permis à cet auteur de décrire trois stades dans la pycnose: un stade 1

avec diminution du volume nucléaire, perte en eau et en protéine, disparition des nucléoles et diminution du taux de D.N.P. par dépolymérisation et synthèse protéique concomitante; si bien que le rapport Feulgen-vert de méthyle, qui est constant dans le noyau normal, augmente dans les cellules dégénérées car le vert de méthyle ne colore que les acides désoxyribonucléiques polymérisés; un stade 2 et un stade 3 avec dépolymérisation plus poussée des D. N. P. et diminution graduelle du volume nucléaire.

— Dans la *caryolyse* le premier stade intéresse le réseau chromatique qui disparaît ainsi que la fine membrane chromatinienne qui double intérieurement la membrane nucléaire proprement dite, si bien qu'on ne distingue plus sa trace que sous forme d'un anneau éosinophile.

— Dans la *caryorrhexie,* le noyau s'émiette en boules condensées en chromatine.

— Mais il nous a été possible d'observer un autre mode de dégénérescence nucléaire; *l'éclatement du noyau ou de la vésicule nucléaire* qui déverse son contenu dans le cytoplasme, la membrane nucléaire disparaît en général sur un hémisphère et la chromatine se disperse dans le protoplasme.

Dans tous ces cas, le stock R. N. P. protoplasmique est conservé au début, ce n'est que par la suite que la basophilie protoplasmique diminue puis disparaît, le cytoplasme ratatiné devenant alors franchement acidophile.

Toutes ces formes de nécrose sont bien visibles dans les zones centro-lobulaires d'hépatite épidémique ou toxique.

Nous avons précédemment décrit (1) les teneurs nucléaires et cytoplasmiques en phosphatases alcaline et acide dans ces diverses modalités de dégénérescence et de nécrose.

7) *Atrophie cellulaire.*

Nous avons pu observer l'atrophie des C. H. dans les cas de compression par la substance amyloïdique, dans des cirrhoses, et des congestions sinusoïdales.

(1) Voir chapitre premier: « Les phosphatases hépatiques ».

Les corps basophiles diminuent de nombre et de taille, si bien que la basophilie protoplasmique devient homogène mais sans jamais disparaître complètement. (Photo 24.)

Cette atrophie est souvent associée à une surcharge pigmentaire biliaire, dans ce cas les corps de Berg sont disséminés dans la partie protoplasmique éloignée des granules pigmentaires ou bien absents.

Lorsque les mécanismes de compression aboutissent à la formation de néocanalicules biliaires, il y a diminution parallèle du nombre et de la taille des blocs de Berg intracytoplasmiques.

8) *Régénération.*

Les C. H. en régénération sont soit dispersées, soit groupées en nodules. Elles révèlent, en règle générale, une augmentation marquée des corps de Berg. Cette apparition de R. N. P. cytoplasmiques fait suite à une synthèse ribonucléique intranucléaire.

Les canalicules biliaires en prolifération, qui ne sont souvent pas différenciables de travées cellulaires hépatiques atrophiées, peuvent parfois révéler une richesse accrue en R. N. P. cytoplasmiques. (Photo 27.)

## II. — ESPACES PORTES ET SINUSOIDES

*Cellules de Kupffer.*

Rares sont les foies pathologiques dans lesquels nous avons rencontré des corps basophiles à l'intérieur du cytoplasme des cellules de Kupffer.

C'est seulement dans les cas « d'hyperactivité Kupfférienne », lorsque ces cellules se mobilisent et prolifèrent qu'elles contiennent des corps basophiles. Ces éléments cellulaires sont alors sphériques et libres dans la lumière des sinusoïdes. Lorsqu'elles contiennent des pigments biliaires ou ferriques ces cellules ne contiennent pas de corps basophiles.

PLANCHE II

## MODALITES CYTOGENETIQUES DES NUCLEOLES VACUOLAIRES DE LA CELLULE HEPATIQUE HUMAINE

— Coloration vert de méthyle pyronine ; en vert : désoxyribonucléoprotéines ; en rouge : ribonucléoprotéines.

— Noyaux isolés de cellules hépatiques provenant d'affections diverses.

— **Figure 1.** — Noyau contenant un nucléole monovacuolaire et un nucléole bivaculolaire au premier stade (Foie normal).

— **Figure 2.** — Nucléole vacuolaire spongieux au premier stade (Réticulose histio-monocytaire).

— **Figure 3.** — Nucléole tétravacuolaire en forme de trèfle à 4 feuilles au premier stade (Hépatite phallo.dienne).

— **Figure 4.** — Nucléole vacuolaire en fin de stade 1 : persistance d'un filament ribonucléique donnant un aspect en trident. Cette figure évoque une origine bivacuolaire probable (Polycorie glycogénique).

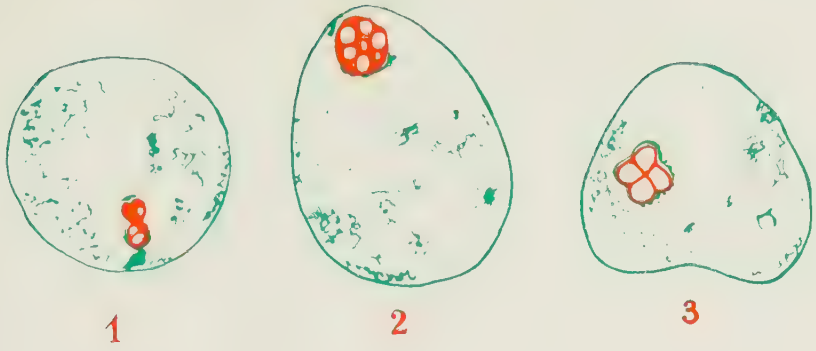
— **Figure 5.** — Enorme nucléole vacuolaire en fin de premier stade. Figure rare (Polycorie glycogénique).

— **Figure 6.** — Pont ribonucléique persistant en fin de premier stade. Figure provenant de la fusion de 2 nucléoles (Polycorie glycogénique).

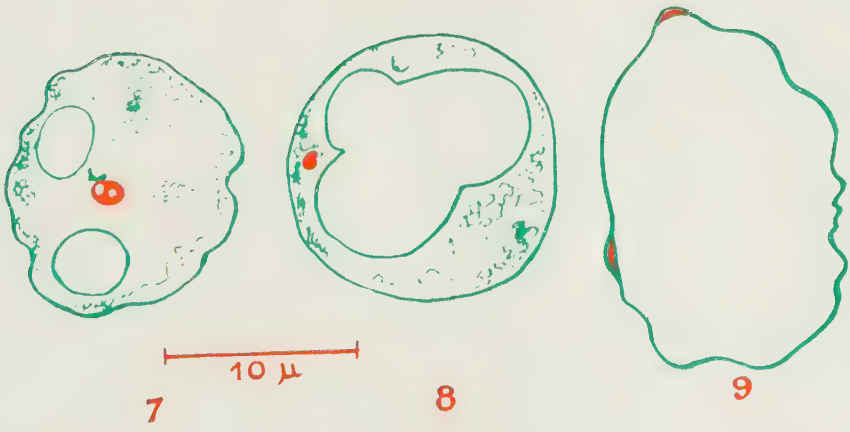
— **Figure 7.** — Noyau fripé contenant un nucléole bivacuolaire au premier stade et deux nucléoles vacuolaires au début du deuxième stade (Hépatite par intoxication à l'atophan).

— **Figure 8.** — Nucléole vacuolaire au deuxième stade présentant un aspect en trèfle et provenant vraisemblablement de la fusion de trois nucléoles vacuolaires en début de deuxième stade (Diabète sucré).

— **Figure 9.** — Noyau fripé réduit à un nucléole vacuolaire en fin de deuxième stade ; les deux nucléoles normaux persistant sont comprimés entre les deux membranes désoxyribonucléoprotéiques, nucléaire externe et nucleolaire interne (Diabète sucré).


1
2
3

4
5
6


10 µ
7
8
9

Notons que les nucléoles vacuolaires aux deux stades, ne sont pas rares au niveau des noyaux des cellules de Kupffer.

Signalons enfin la possibilité de multiplication de ces cellules, nous avons parfois noté des mitoses à leur niveau.

*Plasmocytes.*

Ces éléments sont, on le sait, très riches en R. N. P. protoplasmiques. Celles-ci sont périphériques et délimitent une aire acidophile, « l'archoplasme », coiffant le noyau. La basophilie cytoplasmique n'est pas homogène mais finement granulaire.

On peut suivre tous les intermédiaires entre la cellule de Kupffer et les plasmocytes; aussi sommes-nous tenté de décrire une plasmocytogénèse locale intrahépatique sans qu'il soit possible d'indiquer l'origine de ces R. N. P. cytoplasmiques.

*Mastocytes.*

On trouve parfois des mastocytes dans le tissu conjonctif périportal et les sinusoïdes. Ils ne contiennent pas de R. N. P. protoplasmiques mais des granulations métachromatiques colorées en rouge vif avec le bleu de toluidine et qui sont par ailleurs riches en phosphatases alcaline et acide.

Nous en avons rencontré même dans des foies tout à fait normaux. Leur origine Kupfférienne paraît indiscutable, nous avons vu en effet des cellules de Kupffer, encore attachées à leur sôle réticulaire, contenant des granulations métachromatiques. Ce n'est probablement que par la suite que ces cellules de Kupffer doivent se libérer du filet réticulaire et tomber dans la lumière sinusoïdale.

Moyson a aussi récemment noté (1952) cette origine Kupfférienne de mastocytes dans le choc traumatique.

## CONCLUSIONS

Ces études cytologiques et cytochimiques concernant les N.P. des différents éléments cellulaires du tissu hépatique pathologique, et en particulier de la cellule parenchymateuse, nous ont permis de décrire quelques aspects morphologiques anormaux

peu connus concernant: les nucléoles et la charge ribonucléique des noyaux, les troubles de la mitose et ses modalités, et enfin les diverses surcharges, dégénérescences et nécroses des cellules hépatiques humaines.

### B) Les N. P. et les A. N. dans les affections hépatiques

Notre étude sur les N. P. n'exigeant pas, comme les recherches enzymologiques, des prélèvements extemporanés, nous avons pu les effectuer sur des lames anciennes prélevées dans la riche collection que M. le Professeur Cazal a mise à notre disposition et réaliser ainsi une gamme à peu près complète de foies pathologiques.

## I. — DESCRIPTIONS TOPOGRAPHIQUES

Il serait cependant fastidieux de passer en revue toutes les maladies du foie, aussi schématiserons nous en insistant plus spécialement sur les affections dans lesquelles les variations dans la distribution et les anomalies des N. P. peuvent présenter un intérêt diagnostique, pronostique ou physiopathologique, sans toutefois revenir sur les affections de surcharge déjà mentionnées.

### a) Hépatites

Nous distinguerons, en allant du simple au complexe, les lésions élémentaires puis les différents types étio-anatomiques des hépatites.

#### 1. *Lésions élémentaires.*

Nous les avons déjà décrites en détail, aussi ne ferons-nous que les regrouper ici. Ce sont essentiellement des lésions parenchymateuses et mésenchymateuses.

— Les lésions des C. H. peuvent porter sur leurs noyaux d'abord, et se traduire par les différentes anomalies nucléolaires et mitotiques et les anisocaryoses des deux types (ribonucléo-

protéique et polyploïdie), enfin les dégénérescences diverses et les nécroses. Le cytoplasme présente, souvent, lui aussi, des altérations importantes de sa charge R. N. P. dans les diverses surcharges, certaines lésions étant parfois irréversibles.

— Les lésions mésenchymateuses ont moins d'intérêt. Elles consistent en mobilisation Kupfferienne, et parfois accumulation de corps basophiles intracytoplasmiques et transformation probable de ces cellules en plasmocytes et en mastocytes.

2. *Les N. P. dans les divers types étio-anatomiques d'hépatites.*

Ces variations examinées dans leur ensemble sont d'un grand intérêt.

*Hépatites infectieuses.*

*Le métabolisme des N. P.* varie avec les formes évolutives.

— Dans les cas suraigus, les corps basophiles cytoplasmiques sont fortement diminués ou absents des C. H. toujours vivantes. Ils disparaissent entièrement des cellules qui révèlent une dégénérescence diffuse et dont le cytoplasme prend ça et là une apparence acidophile. Les cellules en nécrose sont franchement acidophiles et sont le plus souvent centrolobulaires. A ce stade succède une période de régénération avec nombreuses mitoses normales et une intense synthèse R. N. P., ce qui signe un excellent pronostic; dans les cas contraires les mitoses sont anormales et le métabolisme R. N. P. est beaucoup plus sporadique car il n'a pas lieu dans toutes les C. H. régénérées.

— Dans les cas aigus (Photo 25), les corps de Berg ne disparaissent en général que dans les zones centrales et intermédiaires, mais jamais périportales; il persiste toujours autour des espaces portes une aire d'apparence générale plus foncée.

Puis succède un stade d'intense régénération R. N. P. centrolobulaire; c'est dans ces cas là que l'on rencontre des cellules de Kupffer plasmocytoïdes persistant parfois longtemps après la convalescence.

Dans les hépatites non spécifiques on trouve l'anisocaryose

R. N. P. et l'anisochromie traduisant un intense métabolisme N. P. réactionnel.

*Au point de vue étiologique*, nous mentionnerons :

— Dans la mononucléose infectieuse les très nombreuses mitoses parfois anormales (Photo 19-20), les corps de Berg en concentration normale mais dispersés dans toute l'aire cytoplasmique, les infiltrats sinusoïdaux à cellules de Kupffer et portaux à cellules rondes. Le métabolisme N. P. est donc ici normal.

— Dans l'hépatite épidémique (Photo 25), l'atteinte hépatique est plus grave, et se traduit par des processus d'hyperhépatie R. N. P. : anisocaryose et anisochromie nucléaire périportale, miroirs fidèles d'un déséquilibre synthétique protéique.

Par ailleurs, nombreuses mitoses de régénérations, puis réapparition de la charge basophile cytoplasmique dans les cellules centrolobulaires.

— Dans l'hépatite leishmanienne le métabolisme N. P. de la C. H. est normal, les perturbations semblent porter uniquement sur les cellules de Kupffer. On trouve en effet la transformation plasmocytaire Kupfférienne. Notons cependant que les cellules étoilées ayant phagocyté des Leishmanies ne sont pas basophiles.

— Dans l'hépatite tuberculeuse, nous avons montré l'absence de corps de Berg du cytoplasme des cellules de Langhans (Photo 23). Par ailleurs, les C. H. ont une topographie basophile normale. Ce n'est que si elles deviennent stéatosiques que les corps de Berg diminuent.

*Hépatites toxiques.*

— Les cas suraigus se traduisent par les mêmes modifications : nécrose centro-lobulaire surtout, avec disparition de la basophilie des cellules en nécrose qui se révèlent acidophiles. Autour de cette zone, transition graduelle avec cellules à distribution cytoplasmique en corps de Berg normale ou à concentration un peu augmentée dans les cellules périportales. La zone nécrosée centro-lobulaire est plus ou moins vaste suivant l'intensité de l'action toxique.

— A ce stade succède une phase de régénération par mitoses décrite dans les hépatites infectieuses.

— Dans le cas de l'hépatite phalloïdienne (Photo 26), on observe de très nombreuses mitoses atypiques coexistant avec des C. H. en nécrose, le poison a donc une action à la fois caryoclasique et caryocinétique. C'est dans ce cas par ailleurs que l'on trouve le plus fréquemment des anomalies nucléaires et des nucléoles vacuolaires au premier stade avec toutes les modalités décrites dans la planche II.

*Ictère grave.*

Dans la forme de sclérohépatite disloquante l'aspect est typique (Photo 27). Enserrés dans une fibrose jeune acidophile et tranchant sur elle, se détachent quelques îlots parenchymateux intensément basophiles. Nous n'avons jamais vu de C. H. aussi riches en corps de Berg que celles-ci. Les noyaux sont gros et présentent toutes les anomalies possibles (nucléoles vacuolaires exceptés). La concentration basophile cytoplasmique est énorme avec parfois de petites vacuoles hyalines englobées dans un anneau R. N. P.

Qui plus est, les néocanilicules biliaires contiennent eux aussi de grandes quantités d'organites basophiles cytoplasmiques.

Tout ceci traduit, sans aucun doute, une intense synthèse R. N. P. vicariante des quelques cellules nobles encore présentes.

### b) Hépatites biliaires

Elles sont caractérisées par la grande richesse basophile des C. H. fonctionnellement actives; cependant les éléments cellulaires en surcharge biliaire ont une concentration cytoplasmique en corps de Berg fort diminuée. Notons dans ces cellules en surcharge (Photo 29) les localisations fréquentes péribiliaires des corps de Berg qui délimitent ainsi les canalicules biliaires intracellulaires.

Les nombreuses cellules de Kupffer en phagie biliaire ont un protoplasme acidophile.

### c) Cirrhoses

Nous pouvons d'emblée opposer les deux types classiques de cirrhoses, car le métabolisme des N. P. se traduit dans ces deux cas par des images bien différentes, du moins au début, car par la suite la caractéristique générale et commune des deux processus est la grande richesse hépatique en corps de Berg.

*Cirrhoses parenchymateuses.*

Ces cirrhoses, dont le type est la cirrhose de Laënnec, sont histologiquement caractérisées par un remaniement architectural important.

La détection des N. P. révèle des anomalies très caractérisées de celles-ci portant surtout sur les charges et les tailles cellulaires différentes (Photo 28).

Dans l'ensemble la basophilie cytoplasmique est supérieure à la normale. On trouve de grosses cellules à énormes noyaux clairs et à gros nucléoles. Leur charge basophile cytoplasmique est très forte. Ces cellules qui apparaissent intensément éosinophiles avec l'hématéine-éosine, sont considérées depuis longtemps comme des éléments en intense fonctionnement. La détection des R. N. P. confirme cette idée: ces cellules sont en intense synthèse protéique.

Par ailleurs, il est facile de constater des anomalies nucléolaires fréquentes (et des nucléoles vacuolaires au premier stade exclusivement). Entre ces éléments, et sans topographie spéciale, on trouve par contre des cellules à petits noyaux dont le cytoplasme peu riche en corps de Berg présente une légère basophilie périphérique.

Les infiltrats sinusoïdaux et les cellules de Kupffer peuvent contenir des corps basophiles.

Toutes ces images reflètent donc un intense métabolisme R. N. P.

*Cirrhoses mésenchymateuses.*

Au début du processus cirrhogène, peu ou pas d'anomalies

nucléolaires et nucléaires, la charge hépatite basophile est normale.

Dans un stade plus avancé de l'évolution, les corps de Berg augmentent en nombre et en taille à l'intérieur de la C. H. sans cependant qu'apparaissent les anomalies nucléaires des cirrhoses parenchymateuses.

On peut aussi trouver des cellules de Kupffer basophiles.

*Cirrhoses pigmentaires.*

Nous avons déjà mentionné (Photo 21), la présence en petite concentration de corps de Berg cytoplasmiques dans les C. H. riches en pigment ferrique et l'idée d'un balancement R. N. P.-fer.

Les noyaux présentent des nucléoles vacuolaires au premier stade à peu près exclusivement sans rapport avec la surcharge pigmentaire protoplasmique.

d) Affections sanguines et réticulaires

*Leucémies.*

Au voisinage des infiltrats sanguins et d'une manière générale, les C. H. sont pauvres en corps cytoplasmiques, ceux-ci font une auréole périnucléaire, tandis que le reste du cytoplasme est parfois franchement éosinophile. Aucune anomalie nucléaire, mais il faut noter la présence fréquente de mastocytes dans les infiltrats.

*Maladie de Hodgkin.*

Les C. H. sont particulièrement riches en corps de Berg. Les anomalies nucléolaires fréquentes portent sur le nombre (augmenté) et la forme de ces organites, il y a peu de nucléoles vacuolaires, et pas de mitoses.

*Réticulose histio-monocytaire.*

C'est ici que nous avons rencontré les plus grosses anomalies N. P.: énormes nucléoles, mitoses atypiques, cellules plurinuclées, noyaux feuilletés... Le cytoplasme des C. H. contient en quantité innombrable de multiples corps de Berg.

e) Cancers du foie

*Métastases.*

On remarque dans ces cas que la basophilie des C. H. normales est supérieure à celle des cellules néoplasiques (Photo 30) ; celles-ci ont un protoplasme basophile mais très homogène sans structure organisée, totalement différent de celui de la C. H.

Au voisinage des travées étrangères, les cellules nobles sont soit normales accusant cependant quelques petites réactions nucléaires (variation de la taille de nucléoles), soit en dégénérescence cytoplasmique acidophile; les cellules affectées par ce processus sont groupées en îlots.

*Epithéliomas hépatiques.*

La C. H. néoplasique est riche en organelles R. N. P. cytoplasmiques; bien que les anomalies nucléaires soient toujours discrètes, et que les mitoses soient rares, il faut noter une anisocaryose parfois énorme et des nucléoles vacuolaires aux deux stades. Ainsi décrite cette cellule néoplasique est bien différente des cellules néoplasiques métastatiques hépatiques de diverses origines; ces divergences portent sur la pauvreté relative d'anomalies nucléaires et la grande richesse en organites cellulaires des cellules hépatiques.

Notons enfin que ces caractères ne permettent que difficilement un diagnostic différentiel des cellules cirrhotiques en intense synthèse R. N. P. déjà décrites.

## 2. — DISCUSSION

— Les descriptions topographiques antérieures se rapportant au même sujet sont toutes fragmentaires et d'ailleurs très récentes.

Nous avons mentionné les travaux de De Brux et Marchand (1949-50), de Mac Kay et Farrar (1950), de Szanto et Popper (1951), tous effectués sur un grand pourcentage d'autopsies.

— Les descriptions, qui concordent dans l'ensemble, présentent cependant des différences notables avec les auteurs. Evi-

demment le mécanisme de la synthèse protéique est inconnu et doit être plus complexe que les schémas proposés.

Il n'y a qu'à lire les travaux de Opie (1946-48), pour se rendre compte de la complexité de certaines descriptions cytologiques touchant ce métabolisme et les interprétations toutes personnelles que cet auteur en a donné.

Il y a cependant identité de dire sur les points principaux, concernant la répartition globale, les modifications des corps de Berg dans des affections d'étiologie différente, leur disparition (chromatolyse de Opie), puis leur réapparition (chromatogénèse de Opie).

Mais aucun des auteurs précités n'a envisagé les anomalies nucléaires, nucléolaires et mitotiques, anomalies pourtant communes et combien précieuses par leur précocité.

— Il resterait évidemment à préciser de nombreux points sur lesquels nous n'avons pas insisté: les rapports des N. P. avec les mitochondries et les microsomes (rapports si discutés actuellement), avec les synthèses lipidiques, glucidiques et biliaires.

Nous nous sommes contentés d'un problème morphologique dont les résultats ne devaient pourtant pas nous décevoir. Mais de très nombreuses questions restent posées et sans réponses.

## 3. — CONCLUSIONS

Mettons en évidence en terminant les principaux caractères des diverses affections.

— *Dans les hépatites toxiques et infectieuses,* on trouve dans les phases suraiguës des phénomènes nécrotiques, suivis de processus régénératifs cellulaires d'abord, R. N. P. ensuite, et d'une petite réaction Kupfférienne.

— *Dans les cirrhoses* les processus aboutissent finalement à une hyperactivité hépatique et Kupfférienne.

Dans les cirrhoses parenchymateuses, les signes d'hépatite prédominent.

Dans les cirrhoses mésenchymateuses pas ou peu de signes d'hépatite.

— *Dans les épithéliomas,* intenses perturbations du métabolisme des N. P. portant sur les noyaux et les cytoplasmes mais sans monstruosités cellulaires.

Il semble donc résulter de tout ceci que la détection histochimique de N. P. n'a que peu d'intérêt diagnostique. Notons cependant que cette détection permet:

— *Une identification facile des anomalies cellulaires, des dégénérescences et des nécroses.* Ainsi dans les hépatites aiguës cette détection permet de « révéler » les cellules encore vivantes dans les magmas nécrotiques centrolobulaires.

— Elle apporte par ailleurs *une aide pronostique enviable* car elle permet dès le premier prélèvement de se rendre compte de l'état fonctionnel hépatique, de la régénération.

Dans les cirrhoses la basophilie est le miroir de l'activité du processus.

Dans les hépatites aiguës l'étude de la régénération R. N. P. peut donner d'utiles indications pronostiques.

Aussi la détection histochimique des N. P. et A. N. hépatiques s'avère-t-elle d'un intérêt non négligeable.

## E) CONCLUSIONS

Au terme de cette étude histochimique des nucléo-protéines et des acides nucléiques du foie humain normal et pathologique, nous allons essayer de dégager en un aperçu, clair et synthétique, les conclusions des divers points de vue que nous avons examinés.

1. *Concernant le problème technique histochimique.* L'entrée en scène récente de deux groupes de méthodes spécifiques a mis entre les mains de l'histologiste deux nouveaux moyens d'investigation incomparables. Il s'agit :

— des techniques histophysiques de Caspersson d'une part;

— des techniques histochimiques portant sur la détection des oses spécifiques (méthodes de Turchini), et sur l'emploi de colorants basiques combinés aux tests enzymatiques ou chimiques d'autre part (méthodes de Brachet).

2. *Concernant la localisation histochimique des N. P. et A. N. du foie humain normal.* Celle-ci, de ce fait, s'en trouve grandement facilitée, et on a pu ainsi démontrer la richesse de la cellule hépatique en R. N. P. cytoplasmiques concrétisées sous forme d'organelles de morphologie variable, ce qui confirme le rôle important que joue le foie dans le métabolisme général des N. P. et dans lequel intervient non seulement le cytoplasme de la C. H., mais aussi son noyau.

3. *Concernant l'aide diagnostique apporté à l'histologiste par ces détections histochimiques sur les foies humains pathologiques.* Elle est faible si l'on veut parler de diagnostic différentiel à l'échelle tissulaire, mais elle permet une appréciation de l'état fonctionnel des N. P. hépatiques à l'échelle lobulaire et à l'échelle cellulaire (cellule hépatique et cellule de Kupffer).

Aussi recommandons-nous l'emploi d'une des méthodes histochimiques précitées (Giemsa acétique par exemple), dans tous les cas où il s'agira d'apprécier le métabolisme des N. P. hépatiques dans un but diagnostique ou pronostique et dans lesquels les méthodes standards de coloration ne sont d'aucun secours.

4. *Concernant l'histophysiologie hépatique et générale.* La contribution histochimique révèle ici toute sa valeur et nous verrons par ailleurs qu'elle déborde sur le domaine de la physiologie cellulaire générale. Bien entendu elle ne résoud pas tous les problèmes fonctionnels, mais le rôle joué dans le métabolisme cellulaire par les N. P. semble primordial.

Nous avons montré de plus, que ces N. P. peuvent être distingués suivant le rôle qui leur est dévolu en:

— N. P. de constitution;
— N. P. de fonctionnement.

— Le premier groupe comprend exclusivement les desoxyribonucléoprotéines à localisation euchromatinienne spécifique, invariables, véritable constante tissulaire et cellulaire (polyploïdie exceptée), dont le rôle dans les mécanismes génétiques est exclusif.

— Le deuxième groupe comprend les ribonucléoprotéines, à localisation hétérochromatinienne spécifique, passant dans le cytoplasme au cours d'un cycle fonctionnel et où elles vont participer à la synthèse des protéines et peut-être d'autres métabolites.

La signification physiologique de ces deux groupes de N. P. est donc fort différente.

TROISIÈME PARTIE

# CONSIDÉRATIONS HISTOPHYSIOLOGIQUES ET HISTOPHYSIOPATHOLOGIQUES

Nous avons dans les deux chapitres précédents précisé les localisations topographiques des phosphomonoestérases et des N. P. hépatiques; cette étude fut seulement morphologique, descriptive et s'adressait à des foies humains normaux et pathologiques.

Mais les études morphologiques doivent s'intégrer dans le plan d'une méthode générale de recherche plus haute afin de collaborer à l'étude des mécanismes, « en un mot elles doivent s'élever à la hauteur de l'histophysiologie et de l'histophysiopathologie ».

Nous voulons, dans cette troisième partie, transposer sur le plan fonctionnel les quelques données acquises par le travail précédent, sur le plan topographique.

*
**

Les deux groupes de recherche choisies: les glycérophosphatases d'une part, les N. P. d'autre part, peuvent paraître, *a*

*priori*, hétéroclites et n'avoir que des rapports forts éloignés. Il n'en est rien.

— Le rôle général des phosphatases découle de leur définition même, à savoir que ce sont des enzymes catalysant l'hydrolyse et la synthèse des esters de l'acide phosphorique dans les tissus; or cet acide joue un rôle fondamental dans toutes les fonctions métaboliques, N. P. compris.

De plus, l'ubiquité de ces ferments traduit nécessairement un rôle général de ces enzymes dans presque tous les métabolismes: la présence dans certains tissus et en particulier dans le foie de deux de ces enzymes est par ailleurs liée à leur participation à des processus particuliers à l'organe d'une part, à un type cellulaire d'autre part.

— Enfin, et c'est le cas du sérum, diverses humeurs renferment des phosphatases provenant probablement d'organes qu'elles baignent et auxquelles on ne peut attribuer aucun rôle particulier car leur présence est en quelque sorte le fait d'un trop plein des organes, mais dont l'origine en majeure partie hépatique est, on le sait, admis par de nombreux auteurs.

— Le rôle des A. N. et des N. P. dans la vie de la cellule est en outre, un sujet brûlant d'actualité. Bien que cette question soit en ce moment en pleine évolution, il nous a cependant semblé utile de discuter les quelques problèmes d'histophysiologie posés par les données histochimiques.

Pour toutes ces raisons nous croyons fondé notre intégration physiologique et physiopathologique.

*
**

Nous serons obligés au cours de ce travail de faire appel aux résultats histochimiques similaires et complémentaires qu'ont obtenu de nombreux auteurs, et de les comparer aux résultats provenant de recherches biochimiques pures, car si jusqu'à ces dernières années l'histologie seule avait permis la démonstration *in situ* des constituants cellulaires la biochimie moderne est arrivée à préciser elle aussi les localisations des divers constituants cellulaires à l'échelle cytologique. Ce but

de prime abord inaccessible, ne put être atteint que par la mise en œuvre de techniques physicochimiques particulièrement précises; par contrifugation fractionnée, on est parvenu à isoler à l'état pur les noyaux cellulaires (Roberts et Lazarow, 1941, Dounce, 1943), et même les chromosomes (Claude, Popper, 1943; Mirsky, 1943), puis les organites cellulaires microscopiques: mitochondries (Bensley et Hoerr, 1934; Claude, 1944; Claude et Fullam, 1945), et submicroscopiques: les microsomes (Claude, 1940; Hogeboom et Pallade, 1947) et les granules de Lazarow (1942). On est ainsi parvenu à doser séparément les activités enzymatiques et à préciser les constitutions chimiques de ces organites cellulaires.

Ce n'est que par la confrontation des résultats obtenus par des méthodes si différentes que certains aspects des fonctions cellulaires et de la multiplicité des combinaisons intra-cellulaires, peuvent être dévoilées.

*
**

Nous proposons donc de suivre le plan suivant :

— Dans le chapitre premier, nous examinerons si l'histochimie des phosphatases hépatiques peut éclairer le problème discuté des hyper-phosphatasémies alcalines de certaines maladies du foie, et le rôle que joue cet organe dans l'origine des phosphatases sériques.

— Dans un deuxième chapitre, nous envisagerons d'une façon plus précise le métabolisme des N. P. hépatiques, leur rôle dans la synthèse des protéines et les rapports éventuels entre les phosphatases et les N. P., autrement dit le rôle de ces enzymes dans le métabolisme des N. P.

— Enfin, dans un troisième chapitre nous essayerons rapidement de préciser divers points concernant le rôle des systèmes phosphatasiques dans les cadres métaboliques glucidique et lipidique.

Nous tirerons de cette étude les conclusions qui s'imposent.

CHAPITRE I

# Origine des phosphatases sériques et des hyperphosphatasémies dans les maladies du foie

Le sérum contient normalement, à un taux constant, de petites quantités de Ph (phosphomonoestérases, phosphodiestérases, pyrophosphatases...).

Les phosphomonoestérases ont seules été étudiées; on retrouve dans le sang les phosphomonoestérases I, II et III.

Leur origine tissulaire est des plus controversée; quant au mécanisme qui préside à l'élévation pathologique du taux sérique de ces enzymes, il est très discuté à deux points de vue:

— l'identification de leur origine;

— la part qui revient à l'augmentation de leur concentration sérique ou à l'activation de la concentration sérique normale préexistante.

Voyons si les faits histochimiques nous permettent de préciser l'origine des phosphatasémies alcaline et acide et leurs variations pathologiques.

## A) PHOSPHATASEMIE ACIDE

Nous serons bref à ce sujet car le dosage de la phosphatasémie acide n'a aucun intérêt dans le diagnostic différentiel des maladies du foie, pour la bonne raison que le taux sérique est toujours normal par opposition au taux sérique constamment élevé observé dans les cas de néoplasme de la prostate (Sullivan 1942, et autres...).

Les quelques auteurs qui se sont occupés de cette question: Courtois et Plumel, 1943; Herbert, 1946; Bénazet, 1948, ont décrit cependant, mais d'une manière inconstante, une très légère augmentation parallèle des phosphatasémies acide et alcaline dans certains cas d'ictères catarrhaux.

Nous avons antérieurement décrit les localisations intra-hépatiques de cet enzyme, l'examen de cette topographie intracellulaire nous a montré la présence presque constante de la Ph acide à l'intérieur de la C. H. seulement (noyau et cytoplasme), à l'exclusion des vaisseaux sanguins et biliaires. Ce fait nous incita à classer cet enzyme dans les diastases « de constitution » par opposition aux diastases de « fonctionnement ».

La C. H. ne semble donc pas excréter cet enzyme dans le torrent circulatoire.

Les cas rares de légère hyperphosphatasémie acide dans certains ictères catarrhaux peuvent très bien s'expliquer par les dégénérescences cellulaires communes dans ces cas-là: les C. H. lésées libérant leur Ph acide constitutive dans le sang, ce qui a pour effet une très légère augmentation du taux de la phosphatasémie acide.

Cette interprétation concorderait avec l'hypothèse de Bénazet, qui envisage à côté de la Ph acide sérique d'origine prostatique, une Ph acide d'origine hépatique dans ces maladies du foie.

L'histochimie semble donc montrer la non participation de la glande hépatique à la formation de la Ph acide sérique normale, et sa participation plus problématique dans les cas d'hyperphosphatasémie acide accompagnant certains ictères catarrhaux.

## B) ORIGINE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE SERIQUE ET DES HYPERPHOSPHATASEMIES DANS LES MALADIES DU FOIE

### *La phosphatasémie alcaline dans les maladies du foie*

La pathologie hépatique a tiré un grand profit de l'étude de la phosphatasémie alcaline que l'on tend à considérer comme susceptible de permettre une distinction entre les ictères par rétention et ceux d'autre origine.

Depuis les premiers travaux de Roberts en 1930, de nombreux auteurs: Austoni et Coggi (1934), Bodansky et Jaffe (1933), King et Armstrong (1934), Mallet-Guy et Excoffier (1942), Sherlock et Walshe (1947), Bauer (1950) et bien d'autres, ont en effet constaté que toute obstruction des voies biliaires, quelle qu'en soit la cause, entraîne une hyperphosphatasémie alcaline laquelle est en général parallèle à la bilirubinémie.

Par contre, les ictères infectieux ou hémolytiques s'accompagnent d'une phosphatasémie normale, en sorte que le dosage simultané des pigments biliaires, présents à un taux élevé dans tous les cas, et de l'activité phosphatasique du sérum, permet le diagnostic différentiel des ictères par rétention et des ictères sans rétention.

Les premières conclusions de Roberts furent confirmées par la suite, cliniquement par Mallet-Guy et Excoffier, Bodansky et Jaffe, Barthelme, King et Harris, Cristol et Cayla (1936), Cayla (1941); et expérimentalement par Armstrong, King et Harris, Shiffman et Winkelman (1939), Wachstein et Zak (1946), Constanzo (1948), Kritzler et Beaubien (1949), Bauer (1950), Freeman (1951), sur des animaux divers.

Cependant, Rutishauser et Bianchi (1938), Greene, Shattuck et Kaplowitz (1934), observèrent une hyperphosphatasémie dans les ictères toxiques humains ou expérimentaux provoqués par des dérivés du méthane. Notons aussi que Langeron, Paget, Danes, Vittu et Legrand (1944-1946) ont vu également des cas d'ictères non mécaniques au cours desquels la phosphatasémie était très élevée, et jugent aléatoire de s'appuyer sur un taux de phosphatasémie pour faire un diagnostic différen-

tiel. Ce sont aussi les conclusions de Chabrol, Blanchon et Pelou (1945).

Néanmoins, compte tenu des réserves formulées, les conclusions de Roberts paraissent devoir être adoptées en ce qui concerne les différenciations des ictères par rétention des autres ictères.

*L'origine de la phosphatasémie alcaline sérique*

Si nous quittons le plan des faits pour passer à celui des interprétations et des mécanismes, les opinions diffèrent bien davantage. A quoi est donc due cette hyperphosphatasémie et plus précisément le foie joue-t-il un rôle dans la formation de la Ph alcaline sérique?

De nombreuses hypothèses ont été émises à ce sujet que nous pouvons classer sous quatre rubriques:

1° Pour certains auteurs, les travaux de Robison et Fell (1929) mettant en évidence l'enzyme au niveau des os et le rendant responsable de la calcification, semblaient prouver *l'origine ostéoblastique de la Ph alcaline du sérum.*

Certaines maladies osseuses s'accompagnant d'une activité accusée des ostéoblastes et d'une hyperphosphatasémie, on en avait déduit que l'enzyme sérique n'était autre que la Ph osseuse.

L'augmentation de la Ph sérique dans les ictères chirurgicaux serait due, pour Austoni et Coggi (1934), Morris et Peden (1937) à l'absence de bile dans l'intestin, car l'absorption intestinale de graisses et du calcium est suspendue et entraîne un dérèglement phosphocalcique provoquant une hyperproduction osseuse de Ph. L'augmentation des Ph sérique et hépatique paraissant de ce fait avoir une origine semblable par hyperproduction osseuse dans les ictères mécaniques et les maladies osseuses.

2° Une deuxième hypothèse soutenue par Thannhauser, Reichel, Grattan et Maddock (1938), rapporte cette hyperphosphatasémie à un processus *d'activation de l'enzyme sérique en concentration normale* par les produits d'origine biliaire. Cette interprétation fut contredite par Delory et King (1944) et

surtout Roche et Courtois (1944), Gould (1944) qui montrèrent que les acides biliaires se comportent au contraire comme des inhibiteurs de la Ph alcaline.

3° Pour d'autres auteurs, la *C. H. ne joue qu'un rôle d'excrétion:* Armstrong et coll. (1934), Maddock et coll. (1942), Dalgaard (1945). Normalement la Ph alcaline sérique qui serait un mélange d'enzymes d'origines diverses (osseuse et hépatique pour Cloetens, 1940; osseuse, hépatique, rénale et intestinale, pour Roche et Courtois, 1944), serait reprise par le foie qui l'excréterait dans la bile et l'intestin (Gutman et coll. 1940). Les hyperphosphatasémies seraient dues à une perturbation de la régulation exercée par le foie sur l'excrétion de l'enzyme, la C. H. lésée est incapable d'assurer son rôle.

4° Enfin, pour d'autres dont Bodansky et Jaffe (1933-1939), Greene et coll. (1934), Freeman et Chen (1938), Bauer (1950), Moyson (1951-1952), il faut attribuer une *origine hépatique* à la Ph alcaline sérique: l'hyperphosphatasémie dans l'ictère mécanique proviendrait de l'augmentation de la production de cet enzyme par la C. H. lésée.

Tout récemment Sarles (1949), Roche et Sarles (1949-1950), ont montré et prouvé en déterminant la constante d'affinité des Ph de diverse origine (osseuse, rénale, intestinale, hépatique), que ces enzymes sont différents et que le sérum humain renferme deux Ph alcalines dont une d'origine inconnue en faible concentration et dont l'autre est d'origine hépatique. Les hyperphosphatasémies des maladies du foie sont dues à une hypersécrétion hépatique. Mais pour expliquer les hyperphosphatasémies des maladies osseuses dans lesquelles on retrouve un enzyme sérique identique à l'enzyme hépatique normal, Sarles est obligé de faire appel à trois hypothèses: celle d'une hypersécrétion hépatique; ou bien à un enzyme d'origine osseuse modifié dans la maladie de Paget et devenant identique à l'enzyme hépatique; ou encore à la synthèse d'un nouvel enzyme osseux identique à l'enzyme hépatique dans ces mêmes maladies.

*Les faits histochimiques et leur interprétation*

Avec la mise en œuvre des méthodes histochimiques de dé-

tection de cet enzyme, le problème a abandonné le plan biochimique pour passer sur le plan histologique. Ces recherches ont porté parallèlement sur des foies humains normaux, des obstructions biliaires expérimentales et des maladies hépatiques humaines diverses.

Rappelons que dans le *foie normal,* on trouve l'enzyme dans le noyau et parfois, mais toujours en petite quantité, dans le cytoplasme de la C. H et de la cellule de Kupffer, la lumière des sinusoïdes et les canalicules biliaires.

Parmi les auteurs qui ont étudié histochimiquement cette Ph alcaline dans les foies normaux, certains attribuent à la C. H. un rôle sécréteur enzymatique, d'autres un rôle excréteur, quant au mécanisme de la production des hyperphosphatasémies alcalines dans les maladies du foie il est aussi controversé:

— D'un côté, Wachstein et Zak (1946) émettent l'idée que dans les cas d'obstruction l'augmentation de la Ph sérique résulte du fait de l'impossibilité dans laquelle se trouve la C. H. d'excréter l'enzyme dans la bile, plus qu'à une augmentation accrue intracellulaire de cet enzyme.

Kritzler et Beaubien (1949) se basant sur les travaux de Kupffer (1899) et Pavel (1947), interprétent l'obstruction comme la régurgitation de la bile à travers les cellules de Kupffer par rupture des canalicules biliaires. Ce rôle des canalicules biliaires a été aussi indiqué par Houd et Mankins (1950).

— Par ailleurs, Moyson (1952), voit dans cette hyperphosphatasémie une hypersécrétion de l'enzyme hépatique.

— D'autres auteurs interprètent différemment les figures histochimiques: Jacoby, Sherlock et Walshe (1947) attribuent à la Ph alcaline sérique une origine extra-hépatique.

Reprenons le *problème dans les diverses localisations.*

— Dans l'ictère par rétention on retrouve topographiquement la Ph là où il y a stagnation de bile, c'est-à-dire dans les C. H. imprégnées de pigments biliaires, dans les canalicules biliaires, les thrombi et les nécroses biliaires. L'excrétion de l'enzyme dans la bile est clairement démontrée dans l'obstruc-

tion biliaire. L'enzyme dans les sinusoïdes hépatiques est le reflet de l'augmentation de la Ph sérique et représente l'obstruction à l'excrétion de l'enzyme par le foie dans la voie normale.

L'étude histochimique de l'ictère par rétention apporte donc une confirmation quant à la source hépatique de la Ph alcaline.

— Si le foie n'était pas la source principale de la Ph, la concentration hépatique en cet enzyme devrait baisser plus qu'augmenter dans les hépatites. Or, c'est le contraire que nous a montré l'histochimie: l'enzyme dans l'hépatite est distribué dans les sinusoïdes, les canaux biliaires et les C. H. Les C. H. excrètent dans un sens anormal, c'est-à-dire vers le sang à cause des obstacles intra-lobulaires des canaux biliaires. Cette obstruction intra-hépatique dans les hépatites a été décrite par Dible, Mac Michael, Sherlock (1943), Caroli, Paraf et Estevé (1950).

Après la guérison l'obstacle est levé en rétablissant le cours de la bile dans les canalicules et en entraînant la Ph (Sherlock et Walshe, 1947).

— Dans les maladies osseuses généralisées (d'après Sherlock et Walshe), les colorations histologiques de routine sont incapables de montrer de lésion hépatique, alors que l'histochimie révèle une distribution enzymatique identique à celle des ictères par rétention. Dans ces cas les ostéopathies sont associées à une hyperphosphatasémie et à une augmentation parallèle de l'enzyme dans les sinusoïdes et les canalicules biliaires. Les faits prouvent que seule la première hypothèse de Sarles est fondée: l'hyperphosphatasémie dans ces maladies osseuses est aussi d'origine hépatique.

Il reste à préciser le *mécanisme qui intervient dans la charge sanguine.*

— Normalement la C. H. ne contient pas d'enzyme dans la périphérie de son cytoplasme adjacent au sinusoïde. Ceci n'exclue pas le rôle sécrétoire dévolu à la C. H.; en effet, comme le font remarquer Kritzler et Beaubien. l'enzyme peut être en concentration trop faible pour être décelé histochimiquement, au bien se trouve-t-il sous une forme inactive, ou encore inhibé par les autres constituants cytoplasmiques.

On peut aussi admettre les vues de Kupffer (1899) et Pavel (1943-1949) qui, quoique non classiquement admises, nous permettent de proposer un mécanisme séduisant de la sécrétion phosphatasique: les cellules étoilées envoyant des prolongements entre les C. H. jusqu'aux canalicules biliaires joueraient un rôle d'intermédiaire transportant la Ph des canalicules biliaires dans les sinusoïdes. Cette hypothèse a le mérite d'expliquer l'absence d'enzyme cytoplasmique hépatique.

— On peut par ailleurs aisément attribuer l'hyperphosphatasémie de l'ictère par rétention à une régurgitation de la bile à travers les C. H. par rupture des canalicules biliaires.

— Ce serait un mécanisme analogue qui présiderait à l'hyperphosphatasémie alcaline des hépatites aiguës puisqu'on tend à admettre actuellement que tous les ictères sont des ictères par obstruction, que celle-ci soit extrahépatique (cas des ictères chirurgicaux) ou intrahépatique (au niveau du canal de Héring pour Caroli, Paraf et Estevé).

— Il resterait à préciser le mécanisme qui préside à l'augmentation du taux sanguin de cet enzyme dans certains cas de maladies osseuses généralisées; seules les hypothèses de Kupffer et de Pavel apportent quelques lumières sur cette augmentation.

*Conclusions.*

De l'interférence des résultats expérimentaux, chimiques et histochimiques, nous pouvons conclure que normalement la C. H., qui secrète continuellement de très faibles quantités de Ph alcaline, en déverse la plus grande quantité dans les canalicules biliaires et le reste dans le sang peut-être par l'intermédiaire de la cellule de Kupffer; dans l'impossibilité d'excréter l'enzyme dans le sens physiologique lors de phénomènes pathologiques, elle régurgiterait dans le sang la bile contenant la Ph alcaline.

Pour employer la terminologie de Montpellier: normalement le trajet suivi par la Ph est hépaton, sang et bile; dans les cas pathologiques l'obstruction des conduits biliaires empêche l'enzyme d'emprunter la voie biliaire. Il n'y a pas d'hyperproduction enzymatique, la C. H. assure son rôle mais dans un sens anormal. La Ph alcaline sérique a une origine hépatique certaine.

CHAPITRE II

# Les phosphatases et le métabolisme des nucléoprotéines et acides nucléiques hépatiques

Si le mécanisme de la dégradation des N. P. semble bien connu, le mystère qui entoure leur synthèse demeure entier ainsi d'ailleurs que le mécanisme de la synthèse des protéines qui est à l'heure actuelle l'une des énigmes les plus mystérieuses et les plus importantes de la biochimie; les hypothèses évidemment ne font pas défaut mais on manque de preuves.

Or, au cours de ces dernières années, certaines constatations sont venues suggérer l'intervention des A. N. dans la synthèse des protéines; ces constatations, nous l'avons vu, ont été faites en utilisant des techniques histochimiques permettant la localisation des A. N. dans la cellule.

Nous allons essayer de montrer que si l'histologiste trouve des documents intéressants portant sur la détection histochimique des N. P., ces mêmes détections, appliquées aux N. P. hépatiques, apportent aussi une contribution intéressante à l'histophysiologie et à l'histophysiopathologie de la glande hépatique.

## A) METABOLISME DES DESOXYRIBONUCLEOPROTEINES

### *D. N. P. constantes tissulaires*

Le comportement des D. N. P. dans le jeûne protéique permit de leur conférer le caractère de constante tissulaire ainsi que le montrèrent Mirsky et Ris, Boivin, Vendrely et Vendrely, Kosterlitz et Davidson, Mandel et coll. (1948-1949-1950).

Comme l'ont montré ces auteurs un jeûne protéique prolongé s'accompagne d'une perte de poids corporel de 40 % ; la quantité absolue d'A. D. N. du foie reste invariable, alors que les A. R. N. varient dans des proportions considérables.

Ils ont pu par ailleurs montrer que la quantité moyenne d'A. D. N. par noyau reste inchangée, malgré les perturbations métaboliques sérieuses subies par la cellule, et le nombre de noyaux hépatiques reste toujours sensiblement constant (1).

Ces constatations, jointes à la démonstration antérieure de la *constance des A. D. N. hépatiques totaux* dans les mêmes conditions, permettent d'affirmer la constance des A. D. N. nucléaires.

### *Polyploïdie des cellules hépatiques*

Les enseignements généraux de la théorie chromosomique, selon laquelle les cellules du germen contiennent un nombre haploïde de chromosomes, et les cellules somatiques un nombre diploïde identique pour tous les tissus, pouvaient faire penser que la quantité d'A. D. N. de divers noyaux somatiques était identique. En réalité on sait que dans tous les tissus, il existe un nombre plus ou moins important de cellules polyploïdes; de ce fait on peut déjà *a priori* conclure à l'inégalité de la concentration des divers noyaux d'un même organe en A. D. N.

Récemment Pasteels et Lison, puis Swift (1950) ont montré, par une technique histochimique ingénieuse, que les quantités d'A. D. N. des noyaux des C. H. du rat sont en rapport de 1, 2, 5 ou 1, 2, 3 et ont ainsi donné une expression histochimique de

(1) Ces faits n'ont cependant pas été confirmés par Ely et Ross en 1951.

la polyploïdie basée sur la réaction de Feulgen, en confirmant les travaux anciens de d'Ancona (1941).

Nous avons aussi signalé l'inégalité de coloration des noyaux des C. H. humaines, inégalité visible avec tous les colorants employés: Feulgen, vert de méthyle, Giemsa, fluorones. Cette évaluation n'est évidemment que semi-quantitative mais elle permet de décrire plusieurs aspects chromatiniens des noyaux hépatiques. Nous avons par ailleurs mentionné les anomalies de la mitose dans les foies pathologiques, qui paraissent aboutir à des noyaux polyploïdes, et il est permis d'en déduire une correspondance cytochimique.

Devant ces faits, il est judicieux de rejeter la conception qui veut que la quantité d'A. D. N. par noyau hépatique soit toujours constante.

*Rôle de la Ph alcaline dans le métabolisme des D. N. P.*

— Nous rappelons que l'A. D. N. est en perpétuel remaniement dans l'organisme: l'emploi de P radioactif et d'N lourd a en effet permis à Hevesy et Ottesen (1942) et à Schoenheimer et Rittenberg (1942) de démontrer qu'il se produit continuellement un renouvellement du P des A. N. et de l'N des purines et des pyrimidines. Ce P se renouvelle à une vitesse très variable d'un organe à l'autre et ce renouvellement est assuré par la Ph alcaline.

— Or, l'histochimie a permis de détecter cet enzyme dans les noyaux. On l'a en effet signalé dans les noyaux de la C. H. depuis longtemps (Gomori et Takamatsu, 1939; Bourne, 1943; Wilmer, Moog, 1944; Krugelis, 1946; etc...)

Danielli et Catcheside (1945) localisèrent plus précisément la Ph alcaline sur les bandes Feulgen positif des chromosomes et font remarquer la coïncidence entre l'activité génétique et l'action enzymatique.

Chevremont et Firket (1950), rapportent aussi l'aspect hétérogène des chromosomes après coloration par la méthode de Gomori: la Ph alcaline semble plus spécialement localisée sur les chromomères et est plus concentrée dans les chromosomes

en mitose, elle est donc en relation avec le métabolisme phosphorique.

Jeener (1946) et Brachet et Jeener (1946-48), notèrent qu'il existe un parallélisme constant et étroit entre la vitesse de renouvellement du phosphore de l'A. D. N. et la teneur en Ph alcaline des noyaux, donc cet enzyme chromatinien assure le renouvellement du P présent dans le molécule. Il faut noter cependant que le renouvellement du P de l'A. D. N. est très lent par rapport à celui de l'A. R. N. à l'exception des organes où les mitoses sont fréquentes et dans les tissus en régénération.

Krugelis, en 1946, a apporté une preuve histochimique de ce rôle: la Ph alcaline spécifique de l'A. D. N. a les mêmes localisations nucléaires que la glycérophosphatase alcaline non spécifique; son action serait précédée par celle d'une phosphorylase.

Friedenwald et Crowell (1949), en faisant des études histologiques sur les tissus frais, ont mis en évidence cette action sur le catabolisme, et non l'anabolisme, de l'A. D. N.; ils pensent, en accord avec Greenstein (1945), qu'il s'agit d'une transphosphorylation plutôt que d'une déphosphorylation. Moog (1946) et Roche (1950) pensent aussi que cet enzyme joue un rôle dans les dégradations plus que dans les synthèses.

Par ailleurs, la Ph alcaline détectée histochimiquement n'est pas due à l'absorption de l'enzyme par la chromatine puisque Mirsky et Pollister (1947) l'ont détectée dans les chromosomes isolés par centrifugation.

— Dans un autre ordre d'idée, il y a des relations entre cet enzyme et les processus de croissance: les noyaux sont plus riches en Ph alcaline dans la régénération des C. H. après hépatectomie expérimentale et dans l'hépatome du rat. (White, Dalton, Edwards (1942), Woodard (1942), Mellors et Sugiura (1948).

— Si donc la Ph alcaline est un complexe attaquant des substrats différents comme l'ont montré Krugelis (1946), Gomori (1949), Friedenwald et Crowell (1949), Newman et coll. (1950), son rôle dans le métabolisme des D. N. P. est indiscutable et elle agit dans le sens d'une dégradation des nucléotides en nucléosides.

*Conclusions.*

La Ph alcaline joue un rôle de premier plan dans le catabolisme de l'A. D. N.; son action est précédée par une phosphorylase et ces deux enzymes interviennent dans le renouvellement de l'A. D. N. des cellules au repos.

Quant au rôle joué par la Ph acide nucléaire, s'il ne semble pas contestable, puisque nous avons vu cet enzyme localisé exclusivement au niveau de l'euchromatine, il est plus difficile à préciser.

## B) METABOLISME DES RIBONUCLEOPROTEINES

### 1° *Ribonucléoprotéines nucléaires et cytoplasmiques*

Comme l'a écrit récemment Brachet: « Il y a de bonnes raisons de penser que l'A. R. N. cytoplasmique provient de celui contenu dans le noyau, peut-être dans les nucléoles » (1952).

Si cette hypothèse est admise par tous les auteurs ceux-ci se partagent quant au *mécanisme envisagé.*

— L'hypothèse de la *synthèse extra-nucléaire des R. N. P. cytoplasmiques* à partir de matériaux provenant du noyau, a d'abord été défendue par Marinesco (1909), puis plus récemment par Caspersson et son école (1935). Pour ces auteurs, les R. N. P. cytoplasmiques prennent naissance à l'extérieur de la membrane nucléaire où elles sont synthétisées à partir d'histones sécrétés par le nucléole. Lagerstedt (1949) le soutient aussi pour les corps de Berg de la C. H.

Brachet (1941) a repris cette hypothèse en la modifiant légèrement.

— D'autres auteurs admettent *l'hypothèse de l'origine directe et intranucléaire des R. N. P. cytoplasmiques.* C'est ainsi que Vogt et Vogt (1948) ont attribué une origine nucléolaire directe aux A. R. N. cytoplasmiques de la cellule nerveuse: le nucléole sécrète des ribonucléotides qui se répandent dans le suc nucléaire et traversent la membrane pour aller former la substance tigroïde cytoplasmique. Ces travaux ont été confirmés en 1950 par Turchini et Khau Van Kien.

En 1949, de Brux et Marchand ont noté un cycle sécréteur nucléo-cytoplasmique des A. R. N. de la cellule hépatique.

— Or, nous avons pu montrer précédemment (*compte tenu des réserves formulées*), *le cycle spécial* de la synthèse nucléaire des A. R. N. Nous avons vu que ceux-ci apparaissent sous forme de minuscules granulations à l'intérieur du noyau, granulations d'origine nucléolaire, ou peut-être hétérochromatique, et que cette sécrétion s'accompagne d'une augmentation parallèle du volume et du nombre des nucléoles. Ces granulations ribonucléiques augmentent en nombre jusqu'à couvrir toute l'aire nucléaire puis seraient excrétées dans le cytoplasme.

Ceci est tout à fait comparable à ce que Granel et Khau Van Kien ont tout récemment décrit (1952) sur le thymus organe particulièrement riche en N. P. Ces auteurs ont en effet constaté un cycle de sécrétion nucléaire de composés ribonucléiques provenant de la transformation de la chromatine et qu'ils identifient, grâce à la réaction aux fluorones combinée aux sels biliaires, à des nucléotides à ribose. Notons cependant que le phénomène se termine par une caryolyse des thymoblastes alors que la C. H. après son stade d'excrétion conserve une morphologie et un fonctionnement normal.

Toutes ces descriptions sont en accord parfait avec les travaux physico-chimiques de Jeener et Szafarz (1950) qui montrent que les A. R. N. sont synthétisés dans le noyau et passent ensuite dans le cytoplasme.

Nous sommes donc en droit de penser que normalement la C. H. contient une charge constante stable ou presque stable de R. N. P. cytoplasmiques (mis à part le « turn over », renouvellement constant) distribuées concentriquement au noyau ou d'une manière diffuse à tout le cytoplasme; cette charge ne s'use que lentement à l'état physiologique si bien que les foies normaux ne contiennent que peu ou pas de stades de sécrétion.

Sous l'influence du jeûne, d'une infection, d'une intoxication aiguë..., ces R. N. P. cytoplasmiques sont les premiers constituants à diminuer (par sécrétion ou absorption ou usure) ou à disparaître, c'est l'élément cellulaire le plus labile et qui est un miroir fidèle de l'activité fonctionnelle de la cellule.

A ce stade succède un stade de synthèse qui s'extériorise sur les coupes par la coexistence de noyaux à des stades de synthèse ribonucléique différents et qui aboutit à la régénération du contenu ribonucléique de la cellule.

Si par contre le processus n'a qu'une action non spécifique, il se traduira par des phénomènes que nous avons appelé « d'irritation »: anisocaryose et anisochromie nucléaire qui ne sont que la traduction d'une hyperhépatie protéique: certaines cellules se mettent à sécréter des quantités énormes de protéines par l'intermédiaire des corps de Berg.

— Une certaine quantité d'A. R. N. semble donc nécessaire au fonctionnement régulier de la C. H.; ces acides prennent peut-être part aux métabolismes glucidiques et lipidiques et ce rôle mériterait d'être étudié.

— Il resterait évidemment à préciser le *mécanisme de cette synthèse ribonucléique*, les liaisons biochimiques qui interviennent, problèmes sur lesquels l'histochimie n'a pu jusqu'à présent apporter de précision.

— En ce qui concerne le *métabolisme des R. N. P. nucléolaires*, nous avons vu le rôle prééminent de cet organite dans la cellule et l'augmentation de son volume parallèle à la synthèse ribonucléoprotéique, sa disparition précoce dans toutes les lésions nucléaires traduisant une évolution mortelle irréversible et sa disparition dans la prémétaphase où il doit concourrir semble-t-il à la synthèse des D. N. P. chromosomiennes.

*Conclusions.*

De cette longue discussion il ressort clairement que les R. N. P. sont des constituants beaucoup plus labiles que les D. N. P., celles-ci étant des constituants stables, des constantes tissulaires dont les variations quantitatives dans les diverses circonstances physiologiques et pathologiques sont nulles et qui n'interviennent pas dans le métabolisme interne cellulaire, elles ne jouent un rôle que dans les mécanismes génétiques.

Les R. N. P., par contre, par leur cycle de sécrétion, par leur

passage dans le cytoplasme; leur disparition au cours de la mitose et de phénomènes pathologiques divers, apparaissent comme des constituants dont le rôle métabolique intra-cellulaire, s'il est encore mal précisé, est incontestable.

2° *Rôle des phosphatases dans le métabolisme des R. N. P.*

— La présence d'une façon constante de la *Ph. alcaline* au niveau des nucléoles d'une part, la richesse de certains constituants ribonucléiques cytoplasmiques en cet enzyme (autre que dans le foie) d'autre part, suscitent l'hypothèse de son rôle dans le métabolisme des R. N. P.

On devrait en trouver donc en grande quantité à l'intérieur du cytoplasme des C. H. aux endroits où se localisent les corps de Berg; il n'en est rien et pourtant Krugelis (1946), Moog (1946), Gomori (1949), Friedenwald et Crowell (1949), ont bien montré avec des substrats spécifiques que la Ph alcaline agit aussi sur le catabolisme des R. N. P.

Le problème posé du rôle de la Ph alcaline dans le métabolisme des R. N. P. cytoplasmiques de la C. H. reste entier.

— Par contre, certains auteurs ont attribué à la *Ph acide*, un rôle dans le métabolisme des R. N. P. dans un sens catabolique et anabolique. C'est ainsi que Bodian et Melors (1944-1945) ont décrit la richesse toute particulière de la cellule nerveuse en cet enzyme après section de ses axones; la Ph acide est localisée aux zones cytoplasmiques contenant les corps de Nissl, qui sont on le sait de nature R. N. P., et sa concentration augmente pendant la chromotolyse et diminue parallèlement à la réapparition de la substance tigroïde.

Or, nous avons noté la richesse cytoplasmique hépatique en Ph acide et il serait logique d'attribuer un rôle à cet enzyme dans le métabolisme des R. N. P. hépatiques. Cependant nous ne croyons pas à ce rôle pour de multiples raisons: d'abord parce que les localisations de la Ph acide que nous avons décrite ne correspondent pas aux localisations des blocs de Berg, ensuite parce que le nucléole qui est aussi constitué d'A. R. N. ne contient pas de Ph acide; de plus, Gomori (1949) a montré avec un substrat spécifique que la Ph acide n'a qu'une action très légère sur l'A. D. N.; enfin parce que les variations d'ac-

tivité observées sur des foies pathologiques sont trop légères pour être interprétées comme les indicateurs d'un trouble dans le métabolisme des R. N. P. cytoplasmiques hépatiques.

*Conclusions.*

L'histochimie ne permet pas de résoudre le problème des rôles joués par les Ph alcalines et acides dans le métabolisme des R. N. P. hépatiques.

## C) LES RIBONUCLEOPROTEINES ET LA SYNTHESE DES PROTEINES

*L'hypothèse que les R. N. P. jouent un rôle dans la synthèse protéique* soutenue par Caspersson et son école, et Brachet, est basée, nous l'avons dit, sur le fait que ces constituants se trouvent en haute concentration dans les cellules qui produisent un intense anabolisme protidique: cellules nerveuses, pancréatiques, antéhypophysaires, embryonnaires, cancéreuses, hépatiques, plasmocytes et lymphocytes... Par ailleurs, la richesse élevée d'une cellule en A. R. N. semble bien précéder la synthèse des protéines.

Devant ce parallélisme, une déduction logique s'imposait, qui fut tirée par Caspersson d'une part, et par Brachet ensuite: c'est l'hypothèse d'un lien entre la richesse en A. R. N. d'une cellule et son aptitude à synthétiser des protéines. Ces deux auteurs furent amenés à élaborer deux théories voisines sur la synthèse des protéines cellulaires.

— Pour Caspersson, en effet, le centre de la synthèse des protéines serait *la chromatine nucléaire;* cette synthèse se ferait sous un double mécanisme. « L'euchromatine, qui supporte les gènes, serait formée de thymonucléohistones et sécréterait les protéines complexes par l'intermédiaire desquelles les gènes agiraient. L'hétérochromatine, qui contient sans doute les deux types d'A. N. donnerait naissance au nucléole: ce dernier serait constitué d'A. R. N. associé à des histones. L'hétérochromatine réglerait le métabolisme des A. N. de la cellule, notamment la teneur en A. R. N. du nucléole et du

cytoplasme. Ce serait enfin l'A. R. N. du cytoplasme qui interviendrait dans la synthèse des protéines cytoplasmiques, tandis que les protéines supérieures spécifiques, par lesquelles les gènes exercent leur action, seraient synthétisées au cours de réactions directement réglées par ces gènes » (Brachet).

Mais le mystère qui entoure cette intervention des R.N.P. demeure entier, car cette théorie basée sur des constatations d'ordre topographique ne renferme aucune suggestion quant au mécanisme par lequel les A. R. N. provoqueraient la synthèse des protéines.

Par ailleurs, « le principal reproche que l'on peut faire à la théorie de Caspersson sous sa forme actuelle réside dans l'impossibilité où nous nous trouvons d'établir un lien biochimique entre l'acide ribonucléique et les protéines: on ne conçoit pas en effet la possibilité d'une transformation d'un A. N. en une protéine ». Cette théorie a le tort de trop insister sur le rôle du nucléole dans la synthèse des protéines.

— C'est ce manque d'arguments qui a amené Brachet, Jeener et Chantrenne à aborder le problème sous un angle différent. Pour eux, l'A. R. N. décelé dans le cytoplasme fait partie en réalité d'un complexe où il est associé à divers enzymes, aussi n'attribuent-ils pas à l'A. R. N. seulement un rôle dans la synthèse des protéines. Ce serait plutôt le *microsome* qui interviendrait dans cette genèse et ceçi semblerait confirmé par la présence constante dans les granules R. N. P. de protéines spécifiques qui seraient élaborées par ces granules car, comme l'a montré Bradefield, les plus gros microsomes contiennent plus de protéines que les petits, et d'ailleurs l'incorporation d'acides aminés marqués se produit dans les protéines hépatiques de manière quasi-élective dans les granules R. N. P., ce qui est une preuve de la synthèse de protéines au niveau de ces organites.

Cette interprétation a le mérite de mieux cadrer avec les idées des cytologistes qui attribuent aux éléments figurés du cytoplasme (mitochondries, ergastoplasme) une activité sécrétrice.

Des recherches histochimiques de Vendrely-Randavel (1949-

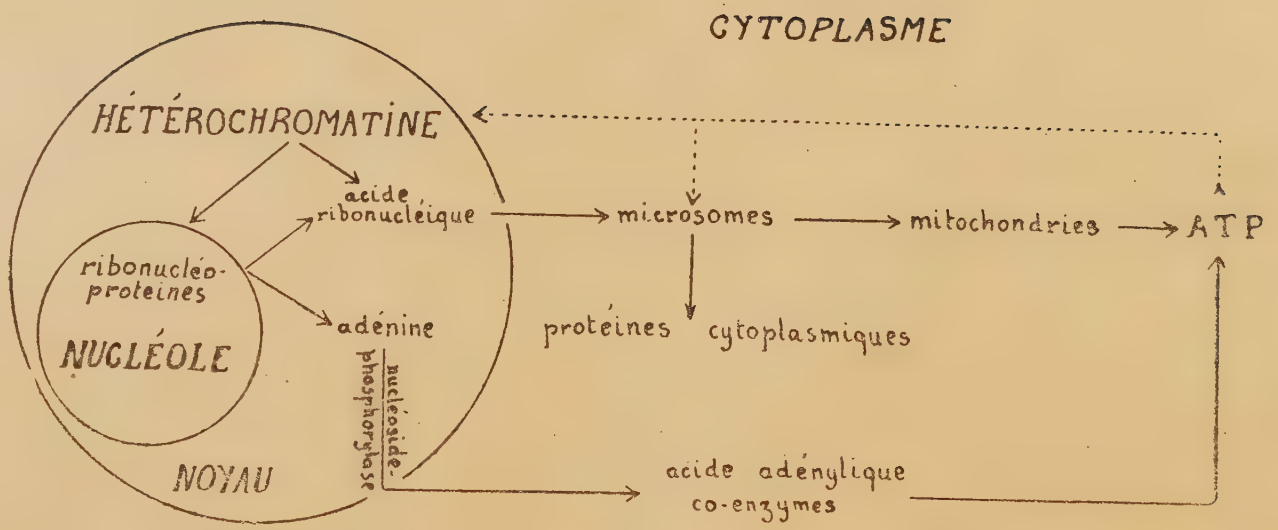



TABLEAU 3 — LES RIBONUCLÉOPROTÉINES ET LEUR ROLE DANS LA CELLULE HÉPATIQUE.
(D'après BRACHET modifié, 1952).

1951) il s'en suit qu'une partie du chondriome seulement renferme de l'A. R. N. et que les microsomes sont plus riches en cet acide. Par ailleurs Lagerstedt (1948) a montré, après centrifugation, que les corps de Berg ne sont que des agglutinats de microsomes, ce qui cadre bien avec l'hypothèse de Brachet.

Pour d'autres auteurs, les mitochondries proviendraient d'agglutination de microsomes (Jeener et Chantrenne, 1948; Haurowitz), avec apport d'enzymes, ceux-ci intervenant dans la synthèse de l'A. T. P. Zollinger (1950) considère les microsomes comme « des formes jeunes de mitochondries ».

En fin de compte les microsomes seuls participeraient à la synthèse des protéines. Ce n'est évidemment que déplacer le problème car le rôle de l'A. R. N. demeure énigmatique; intervient-il par sa configuration spaciale (Haurowitz)? se combine-t-il aux protéines en voie de synthèse pour donner des N. P. insolubles, le produit de la réaction serait ainsi constamment éliminé et l'équilibre se déplacerait vers la synthèse (Reiss, 1942; Chantrenne, 1948)? ou bien constitue-il une source d'énergie en jouant un rôle de donneur spécifique de phosphates (Spiegelman)?

Le fait est que nous en sommes encore réduits à des hypothèses et que l'histochimie n'a pu encore apporter aucune contribution à un tel problème.

Le schéma suivant emprunté à Brachet, que nous avons modifié suivant nos propres recherches, résume, en les complétant, les idées fondamentales de ces discussions.

*Conclusions.*

Toutes les observations cytologiques confirment une corrélation étroite entre les R. N. P. de la C. H. et la synthèse protéique. La nature biochimique de la liaison entre les A. R. N. et les protéines synthétisées n'a pu encore être élucidée.

*
**

On peut, en conclusion de ces deux derniers paragraphes (B et C) distinguer quatre stades dans le métabolisme ribonucléoprotéique de la cellule hépatique humaine:

1° *Stade de synthèse protéique.* — Celle-ci a lieu normalement dans toutes les C. H. sous le « contrôle direct » des R. N. P. cytoplasmiques. Ces protéines secrétées sont probablement déversées dans la circulation (albumines sériques, prothrombine, α-globulines, fibrinogène). C'est la phase anabolique protéique.

2° *Stade de repos ou de décharge,* pendant lequel sous des conditions pathologiques variées ou par un mécanisme physiologique comparable à une « usure », la C. H. perd ses constituants R. N. P. protoplasmiques. C'est la phase catabolique ribonucléo-protéique.

3. *Stade de récupération ribonucléique nucléaire,* par l'intermédiaire de l'hétérochromatine et des nucléoles.

4. *Stade d'excrétion ribonucléoprotéique nucléaire,* avec mise en charge cytoplasmique de constituants R. N. P.

Les stades 3 et 4 formant la phase anabolique ribonucléoprotéique.

## D) LES RIBONUCLEOPROTEINES ET LE METABOLISME DE LA CELLULE HEPATIQUE PATHOLOGIQUE

Il semble donc qu'une *certaine quantité de R. N. P. soit indispensable au métabolisme protéique normal de la C. H.;* ce serait lorsque la concentration de cet acide cytoplasmique diminue que l'accumulation de certains métabolites normaux glucidiques et lipidiques se ferait à l'état libre.

— Les détections histochimiques des N. P. hépatiques permettent une *appréciation fonctionnelle et pronostique* de l'état du foie, portant sur la synthèse de certaines protéines sériques.

— Nous avons vu au cours des *hépatites aiguës,* toxiques et infectieuses, que lorsque le processus n'a été ni trop agressif ni trop prolongé, la richesse basophile intracytoplasmique est conservée. A ce premier stade succède une phase d'intense synthèse ribonucléique et protéique compensatrice des processus

nécrotiques avec alternance de groupements cellulaires en régénération et de groupements cellulaires en nécrose.

— Quand il s'agit *d'hépatites malignes* (type ictère grave), le processus de nécrose cellulaire est si prononcé que la majorité des cellules est atteinte; il y a cependant ça et là quelques tentatives de régénération qui traduisent une défense et un effort synthétiques de la C. H., ce sont les îlots cellulaires persistants et qui sont en intense anabolisme protéique.

— *Dans les hépatites bénignes* par contre, la P. B. F. met en évidence une hyperactivité fonctionnelle et réactionnelle légère.

— Dans les *cirrhoses* enfin, deux cas peuvent être distingués :

Dans les cirrhoses d'origine biliaire, la C. H. n'accuse aucun trouble de son fonctionnement nucléo-protéique, sa charge en R. N. P. cytoplasmiques est normale et traduit donc un métabolisme normal, du moins au début du processus.

Par contre, les C. H. des cirrhoses parenchymateuses (type cirrhose de Laënnec) montrent des variations considérables dans la topographie de leurs R. N. P. cytoplasmiques, traduisant une perturbation fonctionnelle incontestable et il est permis de déduire que la surcharge graisseuse, que l'on voit fréquemment dans ces cas, n'est que la traduction terminale d'une insuffisance métabolique ribonucléoprotéique.

Mais cette détection est cependant incapable de permettre une appréciation de l'activité du conjonctif et de prévoir une évolution cirrhogène ultérieure.

— Quant à la *cancérisation de la C. H.*, elle est caractérisée surtout par des perturbations massives du métabolisme de tous les A. N. portant à la fois sur le noyau et sur le cytoplasme. C'est probablement par leur intermédiaire que s'effectue cette cancérisation.

— Il resterait évidemment à préciser *par quel mécanisme s'effectue la perte des R. N. P. cytoplasmiques hépatiques* dans le jeune protéique et les affections d'étiologie diverse. Notons en effet, comme le faisait remarquer Brachet en 1942, la stabi-

lité particulière des R. N. P. nucléolaires bien différentes de celles du cytoplasme, puisque seules les premières semblent fixes (mitose excepté), les deuxièmes étant les seules à varier.

L'interprétation qui en est donnée varie avec les auteurs.

— Les uns (Lagerstedt, 1949), l'attribuent au jeune protéique par manque de « matériaux ».

— Les autres (Drochmans, 1947; Mac Kay et Farrar, 1950; Moyson, 1952) à l'anoxie, en invoquant la diminution des R. N. P. des cellules de la zone centrolobulaire et médiane; mécanisme qui semble probable dans diverses intoxications, infections, chocs...

— D'autres enfin, à l'action du cortex surrénal (Baker, Ingle, Li, Evans, 1948). Mais Toussaint et d'autres ne sont pas de cet avis.

Le problème, on le voit, n'est donc pas résolu.

Il serait intéressant d'étudier le fonctionnement intime de la C. H. et les processus de régénérations sous l'action des agents lipotropes.

*Conclusions.*

La détection des R. N. P. cytoplasmiques est d'un grand intérêt dans l'appréciation du métabolisme de la C. H. et plus précisément du métabolisme ribonucléoprotéique, cette détermination est une traduction fidèle de l'état fonctionnel du foie, ou plutôt de l'aspect ribonucléoprotéique de celui-ci.

## E) METABOLISME DES NUCLEOPROTEINES ET NUCLEOLES VACUOLAIRES

Nous avons vu les différents aspects des nucléoles vacuolaires, leur cytogénèse et leur devenir probable.

— Mais *l'interprétation de cette anomalie* est très délicate car nous ne possédons pas toutes les données cytologiques et cytochimiques du problème.

Presque tous les auteurs ont considéré ces formations comme

des dégénérescences nucléaires graves (Councilmann et coll. (1900), Krarup et Iversen (1940), Chipps et Duff (1942), seuls Cazal et Mirouze (1951) et Martin et coll. (1952) les considèrent comme une simple anomalie.

Si nous passons en revue la liste des affections dans lesquelles on les rencontre, on s'aperçoit qu'elles intéressent toute la pathologie hépatique: infections, intoxications et troubles métaboliques les plus divers, mais on les trouve à des stades différents de leur évolution, ce n'est qu'une question de degré; *elles n'ont donc rien de spécifique.*

De plus, la présence constante de nucléoles vacuolaires au premier stade, et quelquefois au deuxième, dans des foies par ailleurs tout à fait normaux nous incite fortement à les interpréter non comme une anomalie mais comme un aspect métabolique physiologique particulier, bien que nos prélèvements hépatiques, provenant de sujets hospitalisés pour des affections extra-hépatiques, il est fort possible qu'ils ne soient que la traduction d'une légère perturbation extra-hépatique non spécifique.

Nous avons pu constater la présence de ces nucléoles vacuolaires dans les affections par surcharge (stéatose, amyloïdose, hémochromatose), toutes les hépatites et les affections d'origine biliaire (ictère par rétention, cirrhose biliaire), les cirrhoses parenchymateuses et mésenchymateuse, au voisinage de métastases hépatiques, dans les maladies du sang et des organes hématopoïétiques, dans les réticuloses, au cours des maladies endocriniennes les plus diverses (Basedow, toxicose...) et dans la cellule hépatique néoplasique.

Mais il est un fait certain c'est qu'on les trouve avec plus d'abondance, et presque toujours au stade 2, dans deux affections intéressant le métabolisme glucidique: certains diabètes (hypophysaires et surrénaux) et les polycories glycogéniques (Cazal et Mirouze, 1950-51; Mirouze, 1951). Par ailleurs, l'expérimentation sur l'animal a mis en évidence ces formations dans les jeunes protéiques prolongés (Marchand, 1950).

— Mais rares sont les auteurs qui en ont donné une *explication physiopathologique.*

— Pour Chipps et Duff, le glycogène proviendrait de la vacuolisation.

— Pour Eger et Klarner, ces formations seraient des productions formées à partir de l'acide urique provenant lui-même du catabolisme des matériaux nucléaires; pour ces auteurs l'insuline ferait disparaître ces vacuoles en augmentant la perméabilité de la membrane nucléaire au glycogène.

— Tout récemment, Cazal et Mirouze (1951) ont proposé d'en faire un signe histologique hépatique du syndrome d'adaptation d'après la terminologie de Selye.

Pour ces auteurs, ces vacuoles ne sont que « l'expression d'un catabolisme nucléoprotéique avec anabolisme hydrocarboné facultatif ». Mais cette hypothèse manque de preuves chimiques et histochimiques.

Qui dit catabolisme nucléo-protéique exprime la présence de substances provenant d'actions enzymatiques diverses et qui en dernière analyse sont des pentoses, de l'acide orthophosphorique et des bases hétérocycliques d'une part, des protéines d'autre part. Pour expliquer la formation facultative de glycogène, ces auteurs sont obligés d'admettre une dégradation plus poussée jusqu'aux corps en C3 car les pentoses ne semblent pas pouvoir intervenir dans la synthèse du glycogène.

Or, l'histochimie nous a montré que ces formations évoluent en deux stades :

— Un premier stade, dans lequel il est logique d'admettre que la dégradation des R. N. P. du nucléole s'accompagne d'une synthèse des D. N. P. de la chromatine associée aux nucléoles;

— Un deuxième stade où la vacuole primitive s'accroît et qu'il est bien plus difficile d'interpréter.

En effet, les diverses réactions histochimiques que nous avons exécutées nous permettent d'infirmer la présence de pentoses, d'acide phosphorique et de bases hétérocycliques à l'intérieur des vacuoles.

Nous avons par ailleurs pu saisir la formation du glycogène à l'interface de l'anneau D. N. P. et du contenu vacuo-

laire, ainsi que la présence aussi inconstante de granulations graisseuses phospholipiniques.

Mais cette topographie particulière du glycogène ne prouve pas l'origine nucléo-protéique de ce composé. Nous pensons personnellement que cette vacuole doit contenir des histones, et plus surement des phospholipides qui entrent dans la constitution du nucléole normal; dans le premier stade la transformation de R. N. P. nucléolaires en D. R. P. chromatiniennes semble indiscutable, puisque nous avons vu que parallèlement à l'amincissement de l'anneau interne R. N. P. on voit un élargissement de l'anneau externe D. N. P.; cette synthèse de D. N. P. à partir de R. N. P. nucléolaires ne doit pas obligatoirement succéder à un catabolisme complet de ces N. P. ci, car une transformation directe d'un acide dans l'autre est généralement admise; l'A. R. N. ayant disparu il ne persisterait donc au niveau du nucléole que le substrat phospho-lipidique de cet organite.

Quant au deuxième stade, nous avouerons notre ignorance sur le mécanisme qui préside à sa formation: la présence de glycogène intra-vacuolaire peut très bien s'expliquer, *a priori*, par une synthèse à partir de glucose protoplasmique diffusant dans la vacuole et se transformant en glycogène au niveau de l'anneau chromatinien, il n'est donc pas besoin de faire intervenir un catabolisme D. N. P.

Quoiqu'il en soit l'on ne peut admettre le catabolisme des N. P. avec anabolisme glucidique facultatif de Cazal et Mirouze, sous la forme qu'ont donnée ces auteurs à cette hypothèse, car il est bien prouvé actuellement que la cortisone ou l'A. C. T. H., sous l'influence desquelles ils placent l'origine de ces formations, inhibent la synthèse des protéines tissulaires et provoquent un antianabolisme et non un catabolisme: « la glycogénèse se fait à partir de protéines alimentaires et de leurs acides aminés et non par dégradation des protéines tissulaires ». (Mach et Mach, 1951.)

Enfin, on ne voit pas pourquoi on trouve aussi des nucléoles vacuolaires dans les insuffisances surrénales ou hypophysaires (Addison) et les cellules cancéreuses...

*Conclusions.*

Il est permis d'admettre que les nucléoles vacuolaires sont des aspects morphologiques différents traduisant:

— Au premier stade un catabolisme R.N.P. avec anabolisme D. N. P.;

— Au deuxième stade un catabolisme D.N.P. sans que l'on puisse donner de précision plus formelle.

La présence très rare de nucléoles vacuolaires à différents stades dans un même prélèvement nous a fait admettre leur origine explosive et synchrone et nous incite à considérer deux processus différents suivant le stade (1).

Mais toute interprétation physiopathologique sans bases histochimiques solides est pour le moins prématurée.

Quoiqu'il en soit ces formations ont le mérite de mettre en évidence le rôle que joue le nucléole dans le travail élaborateur de la cellule et son action sécrétrice probable (2).

On ne peut que terminer en répétant ce que Brachet écrivait récemment (1952): « l'attention des chercheurs devra être retenue à l'avenir par les vacuoles intranucléolaires dont le contenu peut être déchargé dans le suc nucléaire ou le cytoplasme; il serait intéressant de parvenir à préciser leur nature chimique car elles pourraient fournir de précieuses indications sur le rôle du nucléole ».

---

(1) Il serait intéressant de reprendre cette étude au microscope à constraste de phases, et nous ne serions pas surpris si ces nucléoles vacuolaires présentaient **in vivo** des mouvements actifs de contraction et de déplétion.

(2) Depuis la rédaction de ce travail, nous avons eu l'occasion de retrouver ces nucléoles vacuolaires aux deux stades dans des cellules les plus diverses de tissus humains normaux et pathologiques: cellules nerveuses, fibroblastes et fibrocytes, cellules épithéliomateuses... Ces formations nucléaires ne sont donc pas, comme il fallait s'y attendre, spéciales au tissu hépatique, ce qui nous confirme dans notre opinion qu'elles ne sont que l'expression d'un aspect général du rôle sécréteur ou élaborateur du nucléole.

## F) RIBONUCLEOPROTEINES KUPFFERIENNES ET GAMMA-GLOBULINES

Cette étude nous permet de faire une rapide incursion dans le domaine de l'immunochimie.

— Nous avons vu l'apparition de corps basophiles intracytoplasmiques dans les cellules de Kupffer et les histiocytes infiltrant les espaces portes, au cours de certaines affections hépatiques: hépatites infectieuses et cirrhoses actives; nous avons de plus noté la transformation possible des cellules de Kupffer en plasmocytes.

— Tout ceci demande une *explication physiopathologique.*

L'hypothèse qui se présente d'emblée est la phagocytose par les cellules de Kupffer des corps de Berg des C. H. lésées, désintégrées ou en nécrose.

Cette possibilité n'est pas probable car la basophilie des C. H. disparaît au cours de la désintégration dès que ces cellules accusent un trouble métabolique nucléo-protéique; ce trouble se traduisant en premier ressort et préalablement à tout autre, par la diminution puis la disparition des corps de Berg.

Il semble plutôt que cette basophilie Kupffférienne soit la traduction d'une réaction réticulo-histiocytaire, réaction mésenchymateuse hépatique, processus primitif ou réponse aux lésions de la cellule noble.

Et ceci semble être prouvé:

— D'une part par la transformation des cellules de Kupffer en plasmocytes telle que nous en avons pu suivre tous les intermédiaires, ce qui confirme l'hypothèse de Dominici, Marchand et Unna, ainsi que les recherches récentes de Gerebtzoff et Dallemagne (1951).

Le rôle de ces éléments plasmocytaires dans la formation des globulines anticorps semble bien prouvé; cet aspect morphologique particulier correspondrait à une physiologie spéciale: la sécrétion de globulines plasmatiques comme le soutient l'école scandinave. Il est en effet bien démontré que la basophilie cytoplasmique des plasmocytes est due à l'A. R. N.,

puisqu'elle disparaît après action de la ribonucléase (Van den Berg) ou de l'acide chlorhydrique normal. Si l'on admet donc les hypothèses de Caspersson et de Brachet, il semble bien que le cytoplasme des plasmocytes soit le siège d'une synthèse active de protéines quel que soit le primum movens invoqué; c'est d'ailleurs la seule théorie admise pour expliquer l'origine de l'hyperglobulinémie sérique dans diverses maladies: sarcoïde de Boeck; maladie de Nicolas et Favre, Kala-Azar (Bing, 1946), maladie de Kahler (Marchal, 1944; Polonovski et Delbarre, 1950).

— D'autre part, par le dosage des γ-globulines parallèlement à cette apparition de corps basophiles intra-Kupffériens comme l'ont réalisé Popper, de la Huerga, Steigmann et Slodki (1950). Ces auteurs ont en effet constaté une augmentation simultanée des corps basophiles intra-Kupffériens et des globulines sanguines au cours des cirrhoses et des hépatites toxiques et infectieuses, en relation donc avec une hyperactivité Kupfférienne histiocytaire et fibrocytaire et ils ont donné à leur dénomination: « hyperactivité Kupfférienne » un sens morphologique (mobilisation) et chimique (augmentation du rapport sérine-globuline), ces deux processus étant pour ces auteurs toujours parallèles.

*L'apparition de corps basophiles à l'intérieur du cytoplasme des cellules de Kupffer serait un signe morphologique de la sécrétion de γ-globulines*, phénomène en tout point comparable à ce que l'on voit dans les éléments lymphoïdes après immunisation (Harris, 1949), et il est possible que les deux réactions: production excessive de γ-globulines et fibroplasie ne soient que l'expression d'un même processus.

La C. H. n'intervenant pas dans la genèse des γ-globulines, mais simplement dans celle des albumines plasmatiques et de quelques α-globulines (prothrombine).

*En conclusion.*

Il semble que l'apparition ou l'augmentation de corps basophiles à l'intérieur du cytoplasme des cellules de Kupffer et des histiocytes, ainsi que la transformation plasmocytaire de ces mêmes éléments, puissent être interprétées comme un signe

morphologique de la formation de γ-globulines (dont une fraction peut constituer des globulines anticorps) que ces cellules sont aptes à synthétiser puisqu'elles font partie intégrante du système réticulohistiocytaire auquel est dévolue cette fonction. (Roberts, White, 1949).

Qu'un problème, apparemment aussi éloigné de l'immunochimie que la basophilie des cellules de Kupffer, nous ait ouvert des horizons aussi largés sur le rapprochement biochimique des R. N. P. cytoplasmiques et des globulines plasmatiques, est un exemple de plus qu'il n'y a pas pour l'histologiste de forme isolée ni pour le biochimiste de problème de chimie pure.

CHAPITRE III

# Les phosphomonoesterases dans divers métabolismes hépatiques

## A) METABOLISME GLUCIDIQUE HEPATIQUE

Il serait hors de propos d'envisager le métabolisme complexe du glucose dans le foie, rappelons-en schématiquement les différentes étapes (1).

*Travaux chimiques :*

— On admettait depuis 1939, avec Cori, Cori et Schmidt, que la glycogenèse et la glycogénolyse hépatiques se faisaient suivant le schéma suivant :

(1) Pour de plus amples renseignements se rapporter au numéro 1 de 1952 de la « Revue Internationale d'Hépatologie » presque entièrement consacré au glycogène hépatique, et à l'ouvrage récent de Benard et Gajdos (1952).

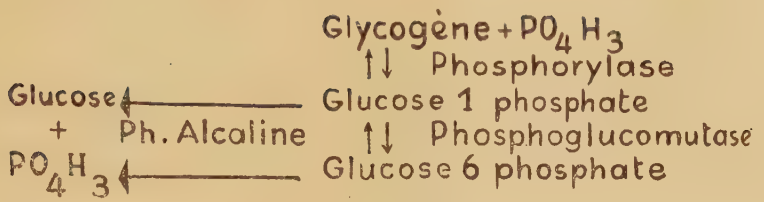



Schéma qui, vu la grande richesse de la C. H. en glycogène, et la sécrétion sanguine probablement continuelle par celle-ci de glucose, exigerait une charge phosphatasique protoplasmique élevée.

Or, les travaux de Dounce, et Dounce et Beyer (1943-1948) mirent en évidence que les noyaux des C. H. contenaient la presque totalité de la Ph alcaline du foie, ce qui cadre bien avec nos recherches de détection enzymatique qui ne mirent en évidence que de très rares granulations phosphatasiques intracytoplasmiques.

— Tout récemment, de Duve, Berthet, Hers et Dupret (1949) puis Hers et de Duve (1950) sont venus confirmer ces faits et leurs travaux permettent d'envisager le métabolisme glucidique sous un angle nouveau.

Ces auteurs ont en effet établi que:

— le foie contient essentiellement une glucose 6 phosphatase;

— le rein contient à la fois une glucose 6 phosphatase et une Ph alcaline;

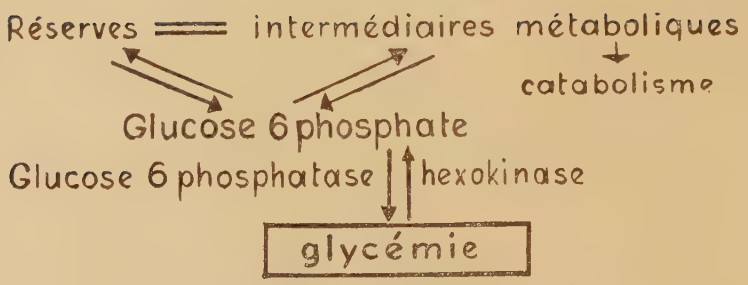
— l'intestin contient essentiellement une Ph alcaline.

Ces trois organes participent à la charge glycémique.

L'intestin contient des Ph non spécifiques alcalines car tous les oses sont absorbés tels quels.

Le foie et le rein qui élaborent du glycogène et le transforment en glucose contiennent une Ph spécifique: la glucose 6 phosphatase, ce qui s'explique par la spécificité du substrat sur lequel elle agit.

Tout ceci amène ces auteurs à proposer un schéma séduisant de la glycogenèse et de la glycogénolyse organiques.




*Travaux histochimiques.*

Ce schéma cadre bien avec ce que l'on sait de l'histochimie des Ph alcalines:

— le foie, nous l'avons vu, ne contient pratiquement pas d'enzyme, en dehors des noyaux et des canalicules biliaires.

— les cellules à plateau strié du grêle, par contre, contiennent une grande quantité de Ph alcaline localisée au cytoplasme apical, à l'appareil de Golgi et au noyau (Gomori, 1941; Bourne, 1943; Emmel, 1945; Dempsey et Wislocki et Dempsey et Deane, 1946; Kosmann et coll., 1943; Verne et Hébert, Al Hussaini, 1948; Souleirac, Tissières, 1948; Hébert, 1950...)

— le rein enfin est très riche en Ph alcaline, celle-ci étant localisée électivement à la bordure en brosse des segments proximaux des tubes contournés, dans les cellules de ces tubes au niveau des bâtonnets de Heidenhain et des noyaux, comme l'ont montré de multiples auteurs (Gomori, 1941; Kabat et Furth, 1941; Bourne, 1943; Menten, Junge et Green, 1944; Wilmer, 1942; Emmel, 1945-46; Wachstein, 1945; Deane et Dempsey, 1946; Lorch, 1947; Cappelin, 1947; Souleirac, 1948; Augeyrolle, 1949...).

Le schéma proposé cadre enfin avec les observations pathologiques concernant le métabolisme des glucides: nous n'avons jamais observé ni d'augmentation ni de diminution de la très faible activité phosphatasique alcaline du cytoplasme hépatique dans les divers diabètes et dans la polycorie glycogénique, contrairement aux travaux de Thannhauser, Soskin et Boncoddo (1940), qui ont trouvé une chute de la Ph alcaline dans trois

cas de maladie de Von Gierke. Il cadre aussi avec les travaux tout récents de Hers et de Duve (1952) qui dans les microsomes isolés du foie décèlent exclusivement la glucose 6 phosphatase tandis que les microsomes du rein et de l'intestin contiennent de la Ph alcaline.

Enfin, les travaux histochimiques de Gomori (1949), ont établi que la Ph alcaline attaque non seulement les glycérophosphates mais aussi le glucose 1 phosphate et non le glucose 6 phosphate.

*Conclusions.*

Il semble donc que le mécanisme de la glycogenèse et de la glycogénolyse hépatiques proposé par Hers et de Duve, s'il demande confirmation, soit plus conforme aux résultats histochimiques que l'ancien schéma proposé en 1939 par Cori, et il serait à ce point de vue très intéressant d'étudier au niveau du foie les localisations histochimiques des Ph spécifiques.

La Ph acide pourrait peut-être jouer un rôle dans ce métabolisme, mais le manque de travaux chimiques à cet égard ne nous permet pas de discuter nos observations histochimiques, bien que Moog (1946) admet que la Ph acide a un rôle glycolytique dans le foie.

## B) METABOLISME HEPATIQUE DES LIPIDES

Nous entrons ici dans un domaine bien peu connu.

S'il ne semble pas que les Ph interviennent directement dans le métabolisme lipidique en ce qui concerne l'absorption intestinale de ces substances, elles semblent par contre prendre une part importante au métabolisme des graisses phosphorées.

— Cependant Nguyen Van Thoai (1944) n'a pu biochimiquement préciser le rôle de ces enzymes dans le métabolisme lipidique hépatique.

— Histochimiquement, Feyel-Cabanes (1949) attribue à la Ph alcaline de la sous-maxillaire de la souris un rôle dans le métabolisme des phospholipines.

Au niveau du foie nous avons vu que la C. H. stéatosique

ne contenait pas de *Ph alcaline*, qu'il s'agisse d'une simple surcharge ou d'une dégénérescence graisseuse et que la *Ph acide* de ces mêmes cellules diminue parallèlement à une augmentation de la charge lipidique. Ceci rejoint les conclusions de Baker, Ingle, Li, Evans (1948) qui n'ont pas noté sur des foies de rat une augmentation de la Ph acide parallèlement à l'infiltration graisseuse, mais plutôt une légère diminution. Il faudrait pouvoir saisir les aspects histologiques correspondant à des résorptions et à des stockages cytoplasmiques de graisses, ce qui est malheureusement fort difficile et serait malgré tout d'interprétation fort délicate.

— Il semble que l'étude histochimique des *estérases et des lipases*, que nous avions envisagée au début de ce travail, mais qu'il nous fut malheureusement impossible de réaliser, apporterait une contribution plus précise à ce problème métabolique.

***

## CONCLUSIONS

L'étude des localisations histochimiques des phosphomonoestérases I et II, et des N. P. de la glande hépatique peut apporter une contribution non négligeable à l'histophysiologie et à l'histophysiopathologie, car elle permet de situer, de façon plus précise que les méthodes biochimiques pures, le siège des métabolismes dans les zones spéciales des différentes cellules.

***

— Le rôle précis dévolu aux *phosphatases* dans les cellules où elles se révèlent ne peut être défini qu'en fonction des propriétés chimiques qui leur sont attribuées par la chimie elle-même. La multiplicité des corps et des substances intermédiaires, voisins les uns des autres, mais différents dans leur structure et leur action, complique le problème de l'interprétation au point de vue histologique.

De ce fait, l'histochimie des Ph non spécifiques ne suffit

pas pour élucider certains aspects histophysiologiques car si elle éclaire singulièrement le rôle du foie dans la genèse de la Ph alcaline sanguine et le rôle de cet enzyme dans le métabolisme nucléoprotéique, elle n'est d'aucun appoint dans les investigations concernant la plupart des autres métabolismes; aussi, l'histologiste devra faire appel à des méthodes permettant de localiser dans telle ou telle partie de la cellule les Ph spécifiques lorsqu'elles sont décelables histo-chimiquement. Car on estime que les Ph se localisent dans les parties des tissus ou des organes que l'on considère comme des lieux de métabolisme particulièrement actifs, et l'on ne peut déceler au niveau du foie qu'une faible activité enzymatique non spécifique, organe qui est pourtant très probablement le siège de la plus grande activité métabolique de tout l'organisme.

Nous pensons donc que l'étude histochimique des glycérophosphatases alcaline ou acide, qui jouent un rôle indiscutable dans le métabolisme des N. P., dans les phénomènes d'ossification, le métabolisme intestinal et rénal des oses, est une étude incomplète ne pouvant déceler toutes les activités possibles des Ph, et dans ce sens, plus que dans tout autre organe, l'étude topochimique des enzymes spécifiques peut donner dans le foie d'excellentes images fonctionnelles pouvant constituer des tests partiels d'activité physiologique car le spectre métabolique de cet organe est le plus étendu.

— Quant *aux N. P. et A. N.*, nous avons vu que la transposition histophysiologique des données histochimiques apporte une contribution certaine à la physiologie cellulaire hépatique.

Elle nous a permis d'interpréter certains stades normaux ou pathologiques du métabolisme des D. N. P. et des R. N. P. au niveau de la C. H. et des cellules de Kupffer et nous permet dans une certaine mesure d'apprécier l'activité fonctionnelle de la glande hépatique.

⁂

Mais l'histochimie, dont les avantages sur les méthodes biochimiques sont évidents, puisqu'elle permet la différenciation et la sélection *de visu* de nombreux types cellulaires ou d'un

même type cellulaire mais à un stade fonctionnel différent, a cependant des limites tracées par la spécificité des méthodes, leur nombre réduit et les images qui ne sont que des étapes qu'il est difficile de hiérarchiser dans le temps, et que « pour remonter jusqu'à la cause nous ne pouvons le faire que par un effort d'imagination qui construit sur des abstractions ».

Aussi nous ne cachons pas que ces données topochimiques n'ont de valeur que lorsqu'on les a passées au crible de la critique:

— histochimique d'abord,

— biochimique ensuite.

C'est ce que nous avons essayé de réaliser tout au cours de cette étude.

# RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Parvenus au terme de ce travail, il ne semble pas superflu de jeter un coup d'œil en arrière pour mesurer le chemin parcouru et peser les résultats acquis.

Au cours de cette étude essentiellement effectuée sur des foies humains, normaux et pathologiques, le plus souvent prélevés par ponction-biopsie, nous avons pu préciser quelques points concernant la structure, la biochimie et la physiologie du tissu hépatique.

Aussi, notre contribution se révèle-t-elle triple: d'ordre morphologique, d'ordre cytochimique et d'ordre fonctionnel, chaque partie envisagée sous le double angle physiologique et pathologique.

⁂

## 1. CONTRIBUTION CYTOMORPHOLOGIQUE

Cette contribution concerne principalement la cellule hépatique.

— Nous avons apporté quelques précisions au sujet de son *noyau:*

— ses nucléoles, leur nombre, leur morphologie et leur structure normales ainsi que leurs modifications physiologiques et pathologiques;

— sa chromatine, sa structure dans l'interphase, les mitoses normales et anormales.

— Quant au *cytoplasme*, nous avons décrit sa charge en nucléoprotéines à ribose et les variations individuelles de celles-ci.

— Enfin, nous avons mentionné quelques formes peu connues de nucléoles anormaux, et spécialement un aspect que nous avons proposé de nommer *nucléole vacuolaire* pour remplacer les anciennes dénominations de noyau vacuolaire ou de noyau à glycogène qui leur étaient appliquées et qui ont le tort de ne pas indiquer l'origine nucléolaire de cette formation.

## 2. CONTRIBUTION CYTOCHIMIQUE

Celle-ci porte sur les phosphomonoestérases, les nucléoprotéines et les acides nucléiques de la cellule hépatique et de la cellule de Kupffer.

— Nous avons décrit les topographies des *phosphatases alcaline et acide* dans les foies normaux et pathologiques, et mentionné le modeste intérêt diagnostique de ces détections dans les stases biliaires.

— Nous avons ensuite envisagé les divers aspects des *nucléoprotéines et des acides nucléiques* des cellules hépatiques et des cellules de Kupffer intercinétiques, leur devenir dans les mitoses normales et anormales, leurs modifications dans les lésions cellulaires élémentaires et dans les affections du foie ainsi que l'intérêt diagnostique de cette détection.

— Enfin, nous avons précisé la structure cytochimique des *nucléoles vacuolaires* aux différents stades de leur évolution, et déterminé la nature de quelques-uns des constituants vésiculaires.

### 3. CONTRIBUTION CYTOPHYSIOLOGIQUE

— Elle intéresse également *les phosphatases* et le problème des origines hépatiques de celles-ci, ainsi que la physiopathologie des phosphatasémies alcaline et acide. Nous avons vu que l'histochimie apporte un argument d'appoint à l'hypothèse de l'origine hépatique de la phosphatase alcaline sérique et des hyperphosphatasémies alcalines des ictères par rétention.

— Nous avons par ailleurs quant au métabolisme des *nucléoprotéines et des acides nucléiques hépatiques*, pu préciser surtout :

— le cycle sécréto-excrétoire nucléaire probable des ribonucléoprotéines de la cellule hépatique;

— l'intervention des acides ribonucléiques dans la synthèse protéique et l'intérêt que présente l'appréciation de ce métabolisme dans les affections hépatiques dans un but pronostique d'estimation fonctionnelle;

— les diverses modalités de l'anisocaryose, polyploïde ou par hyperhépatie ribonucléoprotéique, ainsi que l'anisochromie nucléaire souvent concomitante.

— Enfin, nous avons décrit *la cytogenèse des nucléoles vacuolaires, leur destinée et leur devenir* probables sans avoir pu cependant préciser le mécanisme qui préside à leur formation.

*
**

Nous n'avons pas la prétention d'avoir épuisé les problèmes que nous avions choisis comme sujet d'étude. Nous ne nous dissimulons nullement les lacunes de notre travail et les imperfections des résultats épars et fragmentaires.

On pourra aussi nous reprocher d'avoir peut-être parfois débordé du sujet, mais nous espérons néanmoins avoir fait œuvre utile en rassemblant sous une forme synthétique des notions théoriques, techniques et morphologiques disséminées

dans toute la littérature biologique, une telle synthèse peut s'avérer utile et servir de base à des travaux ultérieurs.

Il serait en effet intéressant de reprendre sur des P. B. F. la détection systématique de tous les autres enzymes décelables histochimiquement: lipase, uréase, phosphatases spécifiques (A. T. phosphatase, glucose 6 phosphatase...) des divers constituants protéiques, des pigments et acides biliaires, du cholestérol, des lipides...

La possibilité d'obtenir du tissu vivant offre un intérêt majeur, puisqu'on pourrait en outre étudier la cellule hépatique en contraste de phases dans des milieux variés et dans des conditions différentes de pH, de pression osmotique, de nutrition...

Puissent les histologistes se rendre compte de la valeur inestimable que présente la P. B. F. non seulement en hépatologie mais en morpho- et en physiocytologie générales: toute précision nouvelle concernant le métabolisme de la cellule hépatique rejaillira obligatoirement sur toute l'histophysiologie.

*
**

C'est de la comparaison des résultats histochimiques, histophysiologiques et biochimiques, c'est de l'emploi conjoint du microscope, du microtome et de l'ultracentrifugeuse que naîtront de précieuses indications sur la structure et les fonctions de la cellule vivante. Car comme l'écrivait récemment Boivin: « il semble permis d'attendre beaucoup d'une telle étude en ce qui concrne une meilleure compréhension de l'un au moins des aspects — l'aspect chimique — du grand mystère de la vie ».

# BIBLIOGRAPHIE

Le nombre de travaux, tant biochimiques qu'histologiques, se rapportant au foie est effrayant. Nous n'avons donc pas la vaine prétention de présenter une bibliographie complète. Nous n'avons mentionné que les publications qui nous ont paru présenter des relations directes avec le sujet envisagé, et celles qui nous ont semblé les plus significatives.

## LE TISSU HEPATIQUE: SA STRUCTURE, SES FONCTIONS


1. ANGULO (J.-J.) et WALSON (J.-H.-L.). — An electron microscopic study of isolated nuclei of liver cell from laboratory animal. — **Science,** 111, 1950, p. 670-673.

2. BAUD (Ch.-A.). — Sur la constitution chimique de la membrane nucléaire. — **Bull. Hist. appliquée,** 26, 1949, p. 12-21.

3. BAUD (Ch.-A.). — Etude de la membrane nucléaire au microscope électronique. — **Bull. Hist. appliquée,** 27, 1950, p. 41-46.

4. BEAMS (H.-W.) et KING (R.-L.). — The origin of binucleate and large mononucleate cells in the liver of the rat. — **Anat. Record,** 83, 1942, p. 281-297.

5. BLALOCK (A.) et MASON (M.). — Observations on blood flow and gaseous metabolism of liver of unanesthetized dogs. — **Am. J. of Physiol.,** 117, 1936, p. 328-334.

6. CAZAL (P.). — Foie et système réticulo-histiocytaire. — **Revue du Foie,** 1, 1944, p. 145-163.

7. CAZAL (P.). — La ponction-biopsie du foie. — Vigot, Paris, 1949.

8. CHEVREMONT (M.). — Contribution à l'étude des microsomes. — **Bull. Ac. Roy. Médecine de Belgique,** 15, 1950, p. 29-39.

9. CLAUDE (M.-D.) et FULLAM (E.-F.). — The preparation of section of guinea-pig liver for electron microscopy. — **J. of Exp. Medi.,** 83, 1946, p. 499-503.

10. D'ANCONA (U.). — Sul polyploidismo delle cellule epatiche. — **Boll. della Soc. ital. di Biol. sperimentale,** 16, 1941, p. 49-50.

11. DEANE (H.-W.). — Cytological study of storage and secretion in developing liver of mouse. — **Anat. Record,** 88, 1944, p. 161-173.

12. ELIAS (H.). — The liver cord concept after one hundred years. **Science,** 110, 1949, p. 470-472.

13. ELIAS (H.). — A reexamination of the structure of the mammalian liver. I. Parenchymal architecture. — **Am J. of Anatomy,** 84, 1949, p. 311-333.

14. ELIAS (H.). — A reexamination of the structure of the mammalian liver-II. The hepatic lobule and its relation to vascular and biliary system. — **Am. J. of Anatomy,** 85, 1949, p. 379-456.

15. GRANEL (F.). — Observations cytologiques sur l'appareil de Golgi de la cellule hépatique du cobaye après injection d'hémoglobine. — **C. R. Ass. Anat. Bordeaux,** 27, 1929.

16. KOSTERLITZ (H.). — Effect of dietary protein on liver cytoplasm. — **Nature,** 1511, 1944, p. 207-208.

17. MAC MAHON (H.-E.). — Uber die physiologishe und pathologishe Teilung von Kern und Zelle in Leber epithelien. — **Ztsch. mik. Anat. Forsch.,** 32, 1933, p. 413-443.

18. NOEL (R.). — Sur l'état binucléé de la cellule hépatique. — **C. R. Soc. Biol.,** 88, 1923, p. 212-214.

19. NOEL (R.). — Recherches histophysiologiques sur la cellule hépatique des mammifères. — **Thèse Sciences,** Paris, 1923 et **Arch. anat. Microsc.,** 9, 1923, p. 1-158.

20. PASTEELS (J.) et LISON (L.). — Teneur des noyaux en acide désoxyribonucléique dans différents tissus chez le rat. — **C. R. Ac. Sciences,** 230, 1950, p. 780-782.

21. PAVEL (I.). — Les ictères. — Masson, Paris, 1949.

22. POPPER (H.). — Signifiance of agonal changes in the human liver. — **Arch. of Path.,** 46, 1948, p. 132-144.

23. SULKIN (N.-M.). — A study of the nucleus in the normal and hyperplastic liver of the rat. — **Am. J. of Anatomy,** 73, 1950, p. 107-125.

24. SWIFT (H.-H.). — The desoxyribonucleic acid content of animal nuclei. — **Physiological Zoology,** 3, 1950, p. 169-198.

25. TURCHINI (J.) et MEITES (M.). — Mécanisme histophysiologique du déclanchement secrétoire dans le foie. Action de l'hypophyse sur le chondriome et sur l'appareil de Golgi hépatiques. — **C. R. Soc. Biol.,** 137, 1943, p. 510-512.

26. WILSON (J.-W.) et LEDUC (E.-H.). — The occurence and formation of binucleate and multinucleate cell and polyploid nuclei in the mouse liver. — **Am. J. of Anatomy,** 82, 1948. p. 353-392.

27. ZOLLINGER (H.-U.). — Les mitochondries. Leur étude à l'aide du microscope à contraste de phases. — **Le Sang,** 5, 1950, p. 696-745.

## HISTOCHIMIE ET HISTOPHYSIOLOGIE DES PHOSPHATASES HEPATIQUES

28. AL HUSSAINI (A.-H.). — Alkaline phosphatase in fish gut. — **Nature,** 161, 1948, p. 247.

29. ARMSTRONG (A.-R.) et BANTING (F.-G.). — The site of the formation of the phosphatase of serum. — **Can. Med. Ass. J.,** 33, 1935, p. 243-246.

30. ARMSTRONG (A.-R.), KING (E.-J.) et HARRIS (R.-L.). — Phosphatase in obstructive jaundice. — **Can. Med. Ass., J.,** 31, 1934, p. 14-20.

31. AUGEYROLLE (J.-M.). — Contribution à l'étude histochimique et histophysiologique des phosphatases. — **Thèse Médecine.** Bordeaux, 20, 1949, 102 p.

32. AUSTONI (B.) et COGGI (G.). — La phosphatase du plasma dans différentes affections (maladies des os, fractures, ictères, dérivation externe de la bile). — **Presse Médicale,** 42, 1934, p. 1594-1596 et 1942, p. 709.

33. BAKER (B.-L.), INGLE (D.-J.), LI (C.-H.) et EVANS (H.-M.). — The effect on liver structure of treatment with adrenocortico-trophin under varied dietary condition. — **Am. J. of Anat.,** 82, 1948, p. 75-104.

34. BARGER (J.-O.). — Simplification of technic for demonstrating alkaline and acid phosphatase in tissue. — **Arch of Path.,** 43, 1947, p. 620.

35. BARTHELME (P.). — Recherches sur la phosphatase sanguine dans les affections hépatiques. — **Thèse Médecine,** Strasbourg, 44, 1939, 87 p.

36. BAUD (Ch.) et FULLERINGER (A.). — Etude cytochimique des ferments de la membrane nucléaire. — **C. R. Ac. Sc.,** 227, 1948, p. 645-646.

37. BAUER (A.). — Clinical and experimental studies of alkaline phosphatase content of blood serum in outflow obstruction at various level of the biliary passages. — **Acta Chir. Scand.,** 100, 1950, p. 228-244.

38. BENARD (H.) et GAJDOS (A.). — Les fonctions hépatiques. Etude physiopathologique. — Masson, Paris, 1952.

39. BENAZET (Cl.-A.). — Etude physiopathologique de la phosphatasémie acide. — **Thèse Médecine,** Bordeaux, 16, 1948, 84 p.

40. BODANSKY (A.). — Non osseous origin of serum phosphatase: the liver. — **Enzymologia,** 3, 1937, p. 258-260.

41. BODANSKY (A.). — **Non osseous origin of serum phosphatase.** — **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,** 42, 1939, p. 11.057 P.

42. BODANSKY (A.) et JAFFE (H.-L.). — Phosphatase studies, IV. Serum phosphatase of non osseous origin. Signifiance of the variations of serum phosphatase in jaundice. — **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,** 31, 1933-34, p. 107-109.

43. BODANSKY (A.) et JAFFE (H.-L.). — Phosphatase Studies. VIII. Increase of serum phosphatase after bile duct ligation in dog. — **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,** 31, 1933-34, p. 1179-1181.

44. BODANSKY (A.) et JAFFE (H.-L.). — Signifiance of clinical and experimental serum phosphatase variations, their osseous and non osseous origin. — **J. Biol. Chem.,** 105, 1934.

45. BODIAN (D.) et MELLORS (R.-C.). — Phosphatase activity in chromatolytic nerve cells. — **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,** 55, 1944, p. 243.

46. BODIAN (D.) et MELLORS (R.-C.). — The regenerative cycle of motoneurons with special reference to phosphatase activity. — **J. Exp. Med.,** 81, 1945, p. 489.

47. BOURNE (G.-H.). — The distribution of alkaline phosphatase in various tissues. — **Quart. J. Exp. Physiol.,** 32, 1943, p. 1.

48. BRACHET (J.) et JEENER (R.). — Phosphatase alcaline des noyaux et vitesse de renouvellement du phosphore de

l'acide thymonucléique. — **C. R. Soc. Biol.**, 140, 1946, p. 1121.

49. BRACHET (J.) et JEENER (R.). — Recherches sur le rôle de la phosphatase alcaline des noyaux. — **Bioch. Biophy. Acta.**, 2, 1948, p. 423-430.

50. BURKE (J.-O.). — Serum alkaline phosphatase in liver disease, a concept of its signifiance. — **Gastroenterology**, 16, 1950, p. 660-668.

51. CAPPELIN (M.). — Une technique pour le dosage cytochimique des phosphatases. — **Bull. Hist. Appl.**, 24, 1947, p. 155-162.

52. CAPPELIN (M.). — Ricerca istochemica della fosfatasi alcalina renale. — **Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.**, 23, 1947, p. 64.

53. CAROLI (J.), PARAF (A.) et ESTEVE (J.). — Etude histopathologique de la rétention biliaire. — **Semaine des Hôpitaux**, 26, 1950, p. 743-759.

54. CAYLA (J.). — Valeur diagnostique de la détermination de l'activité des phosphatases sanguines. — **Ann. Endocrin.**, 2, 1941, p. 2.

55. CAZAL (P.). — La ponction-biopsie du foie. — Vigot, Paris, 1949.

56. CHABROL (E.), BLANCHON (P.) et PELOU (A.). — Les phosphatases permettent-elles de diagnostiquer l'ictère chirurgical? — **Semaine des Hôpitaux**, 21, 1945, p. 1022-1025.

57. CHEVREMONT (M.) et FIRKET (H.). — Phosphatase alcaline dans les cellules cultivées **in vitro**. — **C. R. Soc. Biol.**, 144, 1949, p. 731.

58. CHEVREMONT (M.) et FIRKET (H.). — La phosphatase alcaline dans les cellules cultivées **in vitro**. Ses rapports avec la croissance. — **Arch. de Biol.**, 4, 1949, p. 441-472.

59. CLEVELAND (F.-P.), RICHFIELD (D.-F.), GALL (E.-A.) et SCHIFF (L.). — Needle biopsy of the liver. V. Observation on the distribution of alkaline phosphatase and its diagnostic signifiance. — **Arch. of Path.**, 49, 1950, p. 333-346.

60. CLOETENS (R.). — **Enzymol.**, 9, 1940, p. 98.

61. CORI (G.-T.), CORI (C.-F.) et SCHMIDT (G.). — The role of glucose 1 phosphate in the formation of blood sugar and synthesis of glycogen in the liver. — **J. Biol. Chem.**, 129, 1939, p. 629.

62. COSTANZO (F.). — Blood phosphatase in liver disease (clinical experimental researchs). 1. Phosphatasic activity in mechanical jaundice. — **Pat. Sperim.**, 37, 1948, p. 177-192.

63. COURTOIS (J.). — Les phosphatases dans le cancer de la prostate. — **Semaine Hôpitaux**, 22, 1946, p. 643.

64. COURTOIS (J.) et PLUMEL (M.). — Activités phosphatasiques comparées du sérum et de l'urine. — **Ann. Biol. Clin.**, 9, 1943, p. 252-255.

65. CRISTOL (P.) et CAYLA (J.). — Phosphatémie et phosphatasémie. Méthode de dosage. Interprétation clinique des résultats. — **Bull. des Biologistes Pharmaciens**, 33, 1936, p. 168-183.

66. DALGAARD (J.-B.). — Phosphatase in dogs following bile obstruction and removal of the small intestine. — **Acta Physiol. Scand.**, 16, 1949, p. 287-292.

67. DALGAARD (J.-B.). — Serum and biliary phosphatase in biliary fistula dog. — **Acta Physiol. Scand.**, 16, 1949, p. 293-307.

68. DALGAARD (J.-B.). — Serum phosphatase after nephrectomy and bile obstruction in dogs. — **Acta Physiol. Scand.**, 16, 1949, p. 318-320.

69. DALGAARD (J.-B.). — On the cause of increase in serum phosphatase in obstructive jaundice. — **Acta Physiol. Scand.**, 22, 1951, p. 200-210.

70. DANIELLI (J.-F.). — A critical study of techniques for determining the cytological position of alkaline phosphatase. — **J. Exp. Biol.**, 22, 1946, p. 110-118.

71. DANIELLI (J.-F.). — Cytochemistry. A critical approach. — Wiley. N.-York, 1953, 139 p.

72. DANIELLI (J.-F.) et CATCHESIDE (G.). — Phosphatase on chromosomes. — **Nature**, 156, 1945, p. 294.

73. DEANE (H.-W.). — A cytochemical survey of phosphatase in mammalian liver, pancreas and salivary gland. — **Am. J. of Anat.**, 80, 1947, p. 321.

74. DE DUVE (Ch.), BERTHET (J.), HERS (H.-G.) et DUPRET (L.). — Système hexophosphatasique. I. Existence d'une glucose 6 phosphatase spécifique dans le foie. — **Bull. Soc. Chim. Biol.**, 31, 1949, p. 124-153.

75. DELORY (G.-E.) et KING (E.-J.). — The activation of phosphatase. — **Biochem. J.**, 38, 1944, p. 50-53.

76. DEMPSEY (E.-W.) et DEANE (H.-W.). — The cytological localization, substrate specificity and pH optima of phosphatases in the duodenum of mouse. — **J. Cell. Comp. Physiol.**, 27, 1946, p. 159.

77. DEMPSEY (E.-W.) et WISLOCKI (G.-B.). — Histochemical contribution to physiology. — **Physiol. Rev.**, 26, 1946, p. 1.

78. DIBLE (J.-H.), MAC MICHAEL (J.) et SHERLOCK (S.). — Pathology of acute hepatitis. Aspiration biopsy studies of epidemic arsenotherapy and serum jaundice. — **Lancet**, 11, 1943, p. 402-408.

79. DOUNCE (A.). — Enzymes des noyaux cellulaires du foie du rat. — **J. Biol. Chem.**, 147, 1943, p. 685-698.

80. DOUNCE (A.) et BEYER (T.). — Arginase activity of isolated cellular nuclei. — **J. Biol. Chem.**, 174, 1948, p. 859-872.

81. DOYLE (W.-L.). — Effects of deshydrating agents on phosphatases in the lymphatic nodules of the rabbit appendix. — **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 69, 1948, p. 43-49.

82. EMMEL (V.-E.). — Alkaline phosphatase in the Golgi zone of absorbing cells of the small intestine. — **Anat. Rec.**, 91, 1945, p. 39.

83. EMMEL (V.-E.). — The intracellular distribution of alkaline phosphatase activity following various methods of histologic fixation. — **Anat. Rec.**, 95, 1946, p. 159.

84. EMMEL (V.-E.). — A cytochemical study of the effect of K CN. on alkaline phosphatase activity in the kidney and intestine. — **Anat. Rec.**, 96, 1946, p. 273.

85. ERANKO (O.). — Demonstration of acid phosphatase in tissue sections. — **Ann. Med. Exp. Biol. Fenniae**, 29, 1951, p. 287.

86. FAWCETT (D.-W.). — Histochemical and experimental studies on brown and white adipose tissue. — **Anat. Rec.**, 103, 1949, p. 450.

87. FEIGIN (I.), WOLF (A.) et KABAT (E.-A.). — Histochemical studies on tissue enzymes. VI. A difficulty in the histochemical localization of alkaline phosphatase in nuclei. — **Am. J. of Path.**, 26, 1950, p. 647-659.

88. FEYEL-CABANES (Th.). — Présence et rôle d'une phosphatase dans la sous-maxillaire de la souris. — **C. R. Ass. Anat.**, 57, 1949, p. 219-221 et **C. R. Soc. Biol.**, 143, 1949, p. 230.

89. FIESSINGER (N.) et BOYER (F.). — La phosphatase plasmatique en pathologie hépatique. — **Rev. Méd. Chir. Mal. Foie**, 2, 1935, p. 137.

90. FIESSINGER (N.) et BOYER (F.). — Au sujet de la phosphatase plasmatique. — **Bull. Soc. Fr. Hémat.**, févr. 1935.

91. FREEMAN (S.). — Comparaison des effets de l'hépatectomie et de la ligature du cholédoque sur la phosphatase sérique chez le chien. — **Am. J. Physiol.**, 164, 1951, p. 792-797.

92. FREEMAN (S.) et CHEN (Y.-P.). — Effect of jaundiced blood upon normal dogs with special reference to serum phosphatase. — **J. Biol. Chem.**, 123, 1938, p. 239-246.

93. FREEMAN (S.), CHEN (Y.-P.) et IVY (A.-C.). — On cause of elevation of serum phosphatase in jaundice. — **J. Biol. Chem.**, 124, 1938, p. 79-87.

94. FRIEDENWALD (J.-S.) et CROWELL (J.-E.). — Histochemical studies on nuclic acid phosphatase. — **Bull. J. Hopk. Hosp.**, 84, 1949, p. 567-582.

95. GERALDES-BARBA (F.). — L'activité des phosphatases de la glande tyroïde. — **Arch. Port. Sc. Biol.**, 10, 1950-51, p. 81-85.

96. GLICK (D.). — Techniques of histo and cytochemistry. — Interscience, N.-York, 1951.

97. GOETSCH (J.-B.) et REYNOLDS (P.-M.). — Obtaining uniform results in the histochemical technic for acid phosphatase. **Stain Technol.**, 26, 1951, p. 145-151.

98. GOMORI (G.). — Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections. — **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 42, 1939, p. 23.

99. GOMORI (G.). — Distribution of acid phosphatase in the tissues under normal and pathologic conditions. — **Arch. Path.**, 32, 1941, p. 189-199.

100. GOMORI (G.). — The distribution of phosphatases in normal organs and tissues. — **J. Cell. Comp. Physiol.**, 17, 1941, p. 71.

101. GOMORI (G.). — Calcification and acid phosphatase. — **Am. J. of Path.**, 19, 1943, p. 197-207.

102. GOMORI (G.). — Histochemical demonstration of sites of phosphamidase activity. — **Proc. Soc. Exp. Biol. Medi.**, 69, 1948, p. 407-409.

103. GOMORI (G.). — Histochemical specificity of phosphatases. — **Proc. Soc. Exp. Biol. Medi.**, 70, 1949, p. 7-11.

104. GOMORI (G.). — Sources of error in enzymatic histochemistry. — **J. of Lab. and Clin. Med.**, 5, 1950, p. 802-809.

105. GOMORI (G.). — An improved histochemical technic for acid phosphatase. — **Stain Technol.**, 25, 1950, p. 81-85.

106. GOULD (B.-S.). — Studies on the source of serum phosphatase. The nature of increased serum phosphatase in rat after fat feeding. — **Arch. Bioch.**, 4, 1944, p. 175-185.

107. GOULD (B.-S.). — The action of alkaline phosphatase. — **J. Biol. Chem.**, 156, 1944, p. 365.

108. GREENE (C.-M.), SHATTUCK (H.-F.) et KAPLOWITZ (L.). — The phosphatase of the blood serum in jaundice. — **J. Clin. Invest.**, 13, 1934, p. 1079.

109. GUTMAN (A.-B.), OLSON (K.-B.), GUTMAN (F.-B.) et FLOOD (C.-A.). — Effect of disease of the liver and biliary tract upon the phosphatase activity of the serum. — **J. Clin. Invest.**, 19, 1940, p. 129-152.

110. HARD (W.-L.) et LASSEK (A.-M.). — The pyramidal tract. Effect of maximal injury on acid phosphatase content in neurones of cats. — **J. Neurophysiol.**, 9, 1946, p. 121-126.

111. HARD (W.-L.) et LASSEK (A.-M.). — The pyramidal tract acid phosphatase in the axons of mammals. — **Anat. Rec.**, 94, 1946, p. 391.

112. HEBERT (S.). — La phosphatase alcaline de l'intestin. Etude histochimique expérimentale. — **Thèse Sciences**, Paris, 1950.

113. HERBERT (S.). — The estimation of prostatic phosphatase in serum and its use in the diagnosis of prostatic carcinoma. — **Quat. J. of Med. New Series**, 15, 1946, p. 221-241.

114. HERS (H.-G.), BERTHET (J.) et DE DUVE (Ch.). — Système hexosephosphatasique. III. Localisation intracellulaire des ferments par centrifugation fractionnée. — **Bull. Soc. Chim. Biol.**, 33, 1951, p. 21-41.

115. HERS (H.-G.) et DE DUVE (Ch.). — Système hexosephosphatasique. II. Répartition de l'activité de la glucose 6 phosphatase dans les tissus. — **Bull. Soc. Chim. Biol.**, 32, 1950, p. 20-29.

116. HEVESY (G.-C.) et OTTESEN (J.). — Rate of formation of nucleic acid in the organs of the rat. — **Acta Physiol. Scand.**, 5, 1943, p. 237-247.

117. HOUD (W.) et MANKINS (R.-K.). — Rôle des canalicules biliaires dans la sécrétion de la phosphatase par le foie de lapin. — **Anat. Rec.**, 106, 1950, p. 395.

118. JACOBY (F.). — Use of alkaline phosphatase reaction in a method of demonstrating bile capillaries in rat. — **J. of Physiol.**, 106, 1947, p. 33.

119. JACOBY (F.) et MARTIN (B.-F.). — Histochemical test for alkaline phosphatase. — **Nature**, 163, 1949, p. 875-876.

120. JEENER (R.). — Sur les liaisons de la phosphatase alcaline avec les nucléoprotéines du noyau cellulaire et des granules cytoplasmiques. — **Experientia**, 2, 1946, p. 458.

121. JEENER (R.). — Sur les rapports existant entre la phosphatase alcaline et les nucléoprotéines des noyaux. In **Act. Bioch.** Desoer-Masson, 10, 1957, p. 88.

122. JEENER (R.) et SZAFARZ (D.). — Vitesse de renouvellement et localisation de l'acide ribonucléique. — **Experientia**, 6, 1950, p. 60.

123. KABAT (E.-A.) et FURTH (J.). — A histochemical study of the distribution of alkaline phosphatase in various normal and neoplasic tissues. — **Am. J. of Path.**, 17, 1941, p. 303.

124. KAY (H.-D.). — Plasma phosphatase. The enzyme in diseases, particularly in bone disease. — **J. Biol.**, 89, 1930, p. 249-266.

125. KING (E.-J.) et ARMSTRONG (A.-R.). — A convement method for determining serum and bile phosphatase activity. — **Canad. Med. Ass. J.**, 31, 1934, p. 376-381.

126. KOCHAKIAN (C.-D.), BARTLETT (M.-N.) et MOE (J.). — Effect or high protein and high carbohydrate diets on the arginase and phosphatase of the liver and kidney of the normal and adrenalectomized rat. — **Am. J. of Physiol.**, 154, 1948, p. 489.

127. KOSMAN (A.-S.), KAULBERSG (J.-W.) et FREEMAN (S.). — The secretion of alkaline phosphatase by the dog's intestine. — **Am. J. of Physiol.**, 138, 1943, p. 236.

128. KRITZLER (R.-A.) et BEAUBIEN (J.). — Michrochemical variation of alkaline phosphatase activity of liver in obstructive and hepatocellular jaundice. — **Am. J. of Path.**, 25, 1949, p. 1079-1097.

129. KRUGELIS (E.-J.). — Distribution and properties of intracellular alkaline phosphatase. — **Biol. Bull.**, 90, 1946, p. 220-233.

130. KRUGELIS (E.-J.). — Intracellular alkaline phosphatase activity. — **Genetics**, 31, 1946, p. 221.

131. KUPFFER (C.). — Uber die sogennanten Sternzellen der saügesthiere Leber. — **Arch. f. mikr. Anat.**, 54, 1899, p. 254-288.

132. LANGERON (L.), PAGET (M.), DANES (A.) et VITTU (C.). — Le dosage de la phosphatasémie dans le diagnostic des ictères chroniques. — **Ann. Biol. Clin.**, 2, 1944, p. 211-218.

133. LANGERON (L.), PAGET (M.), DANES (A.), VITTU (C.) et LEGRAND. — L'activité phosphatasique du sérum est-elle un moyen de diagnostiquer surement l'ictère chirurgical? — **Revue Méd. Chir. Mal. du Foie**, 21, 1946, p. 96-98.

134. LASSEK (A.-M.). — The stability of so called axonal alkaline phosphatase as determined by experiments in its stainibility. — **Stain Techn.**, 22, 1947, p. 133-138.

135. LISON (L.). — Recherche histochimique des phosphatases. Etude critique. — **Bull. Hist. Appl.**, 25, 1948, p. 23-41.

136. LORCH (I.-J.). — Note on the cytological localization of alkaline phosphatase. — **Quat. J. Micr. Sc.**, 88, 1947, p. 159.

137. MACARY (J.). — Des corpuscules métachromatiques des Corynebactéries. — **Ann. Inst. Pasteur**, 81, 1951, p. 657.

138. MAC DONALD (F.). — An investigation of the histochemical technique for the localization of acid phosphomonoestérase. — **Quat. J. Micr. Sc.**, 91, 1950, p. 315-330.

139. MADDOCK (S.), SCHMIDT (G.) et THANNAUSER (S.-J.). — The effect of the intraveinous injection of alkaline intestinal phosphatase on dogs following hepatectomy and total abdominal évisceration with and without hepatectomy. — **Feder. Proc.**, 1, 1942, p. 181.

140. MALLET-GUY (P.) et EXCOFFIER (S.). — Dosage des phosphatases dans les ictères. — **Lyon Médical**, 167, 1942, p. 81-90.

141. MALLET-GUY (P.) et EXCOFFIER (S.). — Dosage des phosphatases dans les ictères. — **Lyon Médical**, 168, 1942, p. 101-112.

142. MANHEIMER (L.-H.) et SELIGMAN (A.-M.). — Improvement in the method for the histochemical demonstration of alkaline phosphatase and its role in a study of normal and neoplastic tissues. — **J. of Nat. Cancer Inst.**, 3, 1948, p. 181-199.

143. MELLORS (R.-C.) et SUGIURA (K.). — Alkaline phosphatase activity and basophilia in hepatic cells following administration of butter yellow to rats. — **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 67, 1948, p. 242-246.

144. MENTEN (M.-L.), JUNGE (J.) et GREEN (M.-H.). — A coupling histochemical azodye test for alkaline phosphatase in the kidney. — **J. Biol. Chem.**, 153, 1944, p. 471-477.

145. MENTEN (M.-L.), JUNGE (J.) et GREEN (M.-H.). — Distribution of alkaline phosphatase in the kidney following the use of histochemical azodye test. — **Proc. Soc. Exp. Biol. Medic.**, 57, 1944, p. 82.

146. MOOG (F.). — The distribution in the spinal cord of chick embryos of one to eight days incubation of the phosphomonoestérase. — **Proc. Nat. Acad., Sc.**, 29, 1943, p. 176-183.

147. MOOG (F.). — The physiological signifiance of phosphomonoesterases. — **Biol. Reviews**, 21, 1946, p. 41-59.

148. MOOG (F.) et STEINBACH (H.-B.). — Localization of acid and alkaline phosphomonoesterase in cytoplasm granules. — **J. Cell. Comp. Phys.**, 28, 1946, p. 209.

149. MORRIS (N.) et PEDEN (O.-D.). — Plasma phosphatase in diseases: a review. — **Quat. J. of Medic.**, 30, 1937, p. 211.

150. MOYSON (F.). — Recherches sur le rôle du foie dans la forma-

tion de la phosphatase sérique. — **Acta Gastro. Belg.**, 14, 1951, p. 77-80.

151. MOYSON (F.). — Etude des modifications fonctionnelles et morphologiques du foie dans les états postraumatiques. — **Editions Acta Medica Belgica**, Bruxelles, 1952, 62 p.

152. NEUMAN (H.). — Dépendance of the pH optimum of the phosphomonoesterase 1 on the substrate incubation and on inhibition and activation. — **Bioch. Biophys. Acta**, 3, 1949.

153. NEWMAN (W.), FEIGIN (I.), WOLF (A.) et KABAT (E.-A.). — Histochemical studies on tissue enzymes. IV. Distribution of some enzyme systems which liberate phosphate at pH 9,2 as determined with various substrats and inhibitors. Demonstration of three groups of enzymes. — **Am. J. of Pathol.**, 26, 1950, p. 257-305.

154. NEWMAN (W.), KABAT (E.-A.) et WOLF (A.). — Histochemical studies on tissue enzymes. V. A difficulty in enzyme localization on the acid range due to selective affinity of certain tissue for lead. Its dependance on pH. — **Am. J. of Pathol.**, 26, 1950, p. 489-503.

155. NGUYEN VAN THOAI. — Rôle des phosphatases dans le transport des lipides. — **C. R. Soc. Biol.**, 138, 1944, p. 251.

156. NOBACK (C.-R.). — Alkaline phosphatase and acid phosphatase in the mast-cells. — **Anat. Record.**, 94, 1946, p. 486.

157. NOBACK (C.-R.). — Acid phosphatase in the fibroblast. — **Anat. Record.**, 103, 1949, p. 552.

158. NOBACK (C.-R.) et MONTAGNA (W.). — Some histochemical aspects of the mastcell with special reference to alkaline phosphatase and cytochromeoxydase. — **Anat. Record**, 96, 1946, p. 279.

159. NOBACK (C.-R.) et PAFF (G.-H.). — Localization of acid phosphatase in fibroblasts. — **Anat. Record**, 109, 1951, p. 71-79.

160. PAFF (G.-M.), MONTAGNA (W.) et BLOOM (F.). — Cytochemical studies of normal and tumor mast-cells in tissues and in vitro. — **Cancer Res.**, 7, 1947, p. 798-801.

161. PALADE (G.-E.). — Intracellular distribution of acid phosphatase in rat liver cell. — **Arch. Biol.**, 30, 1951, p. 144-158.

162. PAVEL (I.). — Les ictères. — Masson, Paris, 1949.

163. PEARSON et MORRIONE. — Histochemical studies of alkaline phosphatase at interval during carcinogenesis in rat feed p. dimethyl aminoazobenzène. — **Cancer Res.**, 9, 1949, p. 564.

164. PRINA (C.). — The histochemical determination of lipase, alkaline and acid phosphatases in the granuloma. — **Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.**, 27, 1951, p. 1071-1073.

165. RABINOVITCH (M.). — Nucleolus and nucleolus associated chromatin acid phosphatase reaction. — **Nature**, 164, 1949, p. 878.

166. RABINOVITCH (M.) et ANDREUCCI (D.). — A histochemical study of acid and alkaline phosphatase distribution in normal human bone marrow smears. — **Blood**, 4, 1949, p. 580-594.

167. RABINOVITCH (M.), JUNQUEIRA (L.-C.) et FAJER (A.). — A chemical and histochemical study of the technique for acid phosphatase. — **Stain Techno.**, 24, 1949, p. 147-156.

168. RIBEY (J.-F.) et DRENNAN (J.-M.). — The presence and signifiance of alkaline phosphatase in the cytology of mast-cells. — **J. of Path. and Bacterio**, 61, 1949, p. 245-251.

169. ROBERTS (W.-M.). — Variations in the phosphatase activity of the blood in disease. — **Brit. J. Exp. Path.**, 11, 1930, p. 90-95.

170. ROBISON (R.) et FEEL (H.-B.). — The growth, development and phosphatase activity of embryonic avian femora and limbs buds cultivated in vitro. — **Bioch. J.**, 23, 1929, p. 768-784.

171. ROCHE (J.). — Récentes acquisitions sur la biochimie et la chimie physiologique des phosphatases. — **Act. Biochim.**, 10, 1947, Desoer-Masson.

172. ROCHE (J.) et COURTOIS (J.). — Les phosphatases. — **Exp. Ann. Bioch. médicale**, 4, 1944, p. 219-284.

173. ROCHE (J.) et SARLES (H.). — Spécificité d'organes des phosphatases alcalines animales et origine de la phosphatase alcaline du sérum humain au cours des hyperphosphatasémies. — **Biochim. Biophys. Acta**, 5, 1950, p. 275-284.

174. ROCHE (J.) et SARLES (H.). — Sur l'origine de la phosphatase alcaline du sérum humain à l'état normal et pathologique. — **Bull. Ac. Nat. Méd.**, 133, 1949, p. 415-419.

175. RUTISHAUSER (E.) et BIANCHI (M.). — Etude expérimentale sur les variations de la phosphatase sérique dans les intoxications par les métaux. — **Arch. Int. Pharmac. Thérap.**, 58, 1938, p. 240-247.

176. RUYTER (J.-H.) et NEUMAN (H.). — A critical examination of the histochemical demonstration of the alkaline phosphatase. — **Biochim. Biophy. Acta**, 3, 1949.

177. SARLES (H.). — Recherches sur la nature de la phosphatase alcaline du sérum normal et pathologique. — **Semaine des Hôpitaux**, 88, 1949, p. 3676-3679.

178. SCHIFFMANN (A.) et WINKELMAN (L.). — Influence of the liver on serum phosphatase. — **Arch. Int. Med.**, 63, 1939, p. 919-929.

179. SCHOENHEIMER (R.) et RITTENBERG (D.). — Dynamic of body constituents. — Cambridge, Mass., 1942.

180. SHERLOCK (S.) et WALSHE (V.). — Hepatic alkaline phosphatase. Histological and microchemical studies on liver tissue in normal subjects and in liver and in bone diseases. — **J. of Path. and Bacter.**, 59, 1947, p. 615-630.

181. SOULEIRAC (A.). — Localisation histochimique de la phosphatase alcaline (phosphomonoesterase) dans le tube digestif et le rein du rat. — **C. R. Soc. Biol.**, 142, 1948, p. 645.

182. SOULEIRAC (A.). — Action de la lactoflavine sur la phosphatase alcaline de l'intestin et du rein du rat surrénalectomisé. — **C. R. Soc. Biol.**, 142, 1948, p. 779.

183. STAFFORD (R.-O.) et ATKINSON (W.-B.). — Effect of acetone and alcohol fixation and paraffine embedding on activity of acid and alkaline phosphatases in rat tissues. — **Science**, 107, 1948, p. 279-281.

184. SULKIN (M.-M.) et GARDNER (J.-H.). — The acid and alkaline phosphatase activity in the normal and recovering liver of the rat. — **Anat. Rec.**, 100, 1948, p. 143.

185. SUMNER (J.-B.) et MYRBACK (K.). — The enzymes. Chemistry and mechanism of action. — Academic Press., New-York, 1950, 1952, 4 tomes.

186. SUMNER (J.-B.) et SOMERS (G.-F.). — Chemistry and methods of enzymes. — New-York, Academic Press, 1947.

187. TAKAMATSU (H.). — Histologische und biochemische Studien über die Phosphatase (I Mitteilung). Histochemische Untersuchungs methodik deren Verteilung in vershiedenen Organen und Geweben. — **Tr. Jap. Path. Soc.**, 29, 1939, p. 492.

188. TAKAMATSU (H.) et OTSUKI (T.). — Untersuchungen über die Phosphatasereaktion der Leberzellen der normalen und der mit o.-aminoazotoluol Diaet geffuterten Ratten. — **Gann.**, 35, 1941, p. 283.

189. TAKEUCHI (T.) et TAKAMATSU (H.). — I. Histologische und biochemische Studien über die Phosphatase in tuberkulösen Herden. — **Tr. Jap. Path. Soc.**, 29, 1939, p. 490-492.

190. TAKEUCHI (T.) et TAKAMATSU (H.). — II. Uber die Tuberkulose beim Menschen und über experimentall erzeugte Tuberkulose (T. bovinus) beim Meerschweinschen. — **Tr. Jap. Path. Soc.**, 30, 1940, p. 127-130.

191. THANNHAUSER (S.-J.), REICHEL (M.), GRATTAN (J.-F.) et

MADDOCK (S.). — Studies on sérum phosphatase activity. Studies concerning increased serum phosphatase values in disease. — **J. Biol. Chem.**, 121, 1937, p. 727-736.

192. THANNHAUSER (S.-J.), REICHEL (M.), GRATTAN (J.-F.) et MADDOCK (S.). — Studies on serum phosphatase activity. The influence of sera with high phosphatase activity on normal sera. — **J. Biol. Chem.**, 124, 1938, p. 631-637.

193. THANNHAUSER (S.-J.), SOSKIN (S.-Z.) et BONCODDO (N.-F.). — The amylolitic and phosphatase activity of liver tissue in von Gierke's disease. — **J. Clin. Invest.**, 19, 1940, p. 681.

194. TISSIERES (A.). — L'activité des phosphomonoestérases et des pyrophosphatases dans le rein et l'intestin du rat surrénalectomisé et l'action du désoxycorticostérone. — **Acta Anat.**, 5, 1948, p. 224-234.

195. VERNE (J.) et HEBERT (S.). — Etude histochimique des phosphatases alcalines de l'intestin de rat dans leur rapport avec la corticosurrénale. — **C. R. Soc. Biol.**, 142, 1948, p. 300.

196. VERNE (J.) et HEBERT (S.). — Les hormones stéroïdes sexuelles et l'activité mise en évidence histochimiquement de la phosphatase alcaline de l'intestin chez le rat surrénalectomisé. — **C. R. Soc. Biol.**, 143, 1949, p. 201.

197. WACHSTEIN (M.). — Influence of dietary deficience and various poisons on histochemical distribution of phosphatases in liver. — **Arch. of Path.**, 40, 1945, p. 57.

198. WACHSTEIN (M.). — The demonstration of enzymatic activity in tissue section. — **Proc. N. Y. Ass. Pul. Health. Lab.**, 26, 1946, p. 10.

199. WACHSTEIN (M.). — Alkaline phosphatase activity in normal and abnormal human blood and bone marrow smears. — **J. Lab. Clin. Méd.**, 31, 1946, p. 1.

200. WACHSTEIN (M.). — Dithioxamide for the simultaneous demonstration of preformed calcium and alkaline phosphatase. — **Stain Techn.**, 27, 1952, p. 338.

201. WACHSTEIN (M.) et ZAK (F.-G.). — Histochemical distribution of alkaline phosphatase in dog liver after experimental biliary obstruction. — **Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.**, 62, 1946, p. 73-78.

202. WACHSTEIN (M.) et ZAK (F.-G.). — Distribution of alkaline phosphatase in the human liver. — **Arch. of Patho.**, 42, 1946, p. 501-516.

203. WACHSTEIN (M.) et ZAK (F.-G.). — Alkaline phosphatase in

experimental biliary cirrhosis. — **Am. J. Clin. Path.**, 20, 1950, p. 99-115.

204. WHITE (J.), DALTON (A.-J.) et EDWARDS (J.-E.). — Pathology of rat hepatoma 31. — **J. of Nat. Cancer Inst.**, 2, 1941, p. 539-554.

205. WILMER (E.-N.). — The localization of phosphatase in tissue culture. — **J. Exp. Biol.**, 19, 1942, p. 11.

206. WISLOCKI (G.-B.) et DEMPSEY (E.-W.). — Observation on the chemical cytology of normal blood and hematopoïetic tissues. — **Anat. Rec.**, 96, 1946, p. 249.

207. WOLF (A.), ELVIN (M.-D.), KABAT (E.-A.) et NEWMAN (W.). — Histochemical studies on tissue enzymes. III. A study of the distribution of acid phosphatase with special reference to the nervous system. — **Am. J. of Path.**, 19, 1943, p. 423-439.

208. WOODARD (H.-O.). — Acid and alkaline phosphatase in tissue and serum. — **Cancer Res.**, 2, 1942, p. 497-508.

209. YOKOYAMA (H.-O.), STOWELL (R.-E.) et MATHEWS (R.-M.). — Evaluation of histochemical alkaline phosphatase techniques. — **Anat. Rec.**, 109, 1951, p. 139-159.

## HISTOCHIMIE ET HISTOPHYSIOLOGIE DES NUCLEOPROTEINES ET ACIDES NUCLEIQUES HEPATIQUES

210. ADDIS (T.), POO (L.-J.) et LEW (W.). — Quantities of protein lost by various organs and tissues of body during fast. — **J. Biol. Chem.**, 115, 1936, p. 111-116.

211. ADDIS (T.), POO (L.-J.) et LEW (W.). — Protein loss from liver during two days fast. — **J. Biol. Chem.**, 115, 1936, p. 117-118.

212. ADDIS (T.), POO (L.-J.) et LEW (W.). — Rate of protein formation in organs and tissues of body after casein refeeding. — **J. Biol. Chem.**, 116, 1936, p. 343-352.

213. AFANASSIEF (M.). — Uber anatomische Veränderungen der Leber während verschiedener Taetigkeitszustande. — **Arch. f. d. ges. Physiol.**, 30, 1882-83, p. 385-436.

214. ALMEIDA (C.). — Zur Kenntnis der Vakuole des Fettzellen Kernes. — **Anat. Hefte I Abteilung**, 38, 1899, p. 1-11.

215. ARON (M.). — Sur le développement des voies biliaires intra-hépatiques et l'établissement de la fonction biliaire du foie. — **C. R. Soc. Biol.**, 85, 1921, p. 110-112.

216. ASKANAZY (M.-P.) et HUEBSCHMANN (P.). — Uber glycogenschwellung der Leberzellkerne besonders bei Diabetes. — **Zentralblatt f. alg. Path.**, 16, 1907, p. 641-644.

217. AUGEYROLLE (J.-M.). — Contribution à l'étude histochimique et histophysiologique des phosphatases. — **Thèse Médecine**, Bordeaux, 20, 1949, 102 p.

218. BAKER (B.-L.), INGLE (D.-J.), LI (C.-H.) et EVANS (H.-M.). — The effect on liver structure of treatment with adrenocroticotrophin under dietary condition. — **Am. J. of Anat.**, 82, 1948, p. 75-104.

219. BARRY (J.). — Les chromosomes. — **Biologie médicale**, 41, 1952, p. 184.

220. BEAMS (H.-W.) et KING (R.-L.). — The origin of binucleate and large mononucleate cells in the liver of the rat. — **Anat. Rec.**, 83, 1942, p. 281-297.

221. BENSLEY (R.-R.) et GERSH (I.). — Studies on cell structure by freezingdrying method: distribution in cells of basophilic substances, in particular Nissl substance of nerve cell. — **Anat. Rec.**, 57, 1933, p. 369-385.

222. BENSLEY (R.-R.) et HOERR (N.-L.). — Studies on cell structure by freezingdrying method: preparation and properties of mitochondria. — **Anat. Rec.**, 60, 1934, p. 449-455.

223. BERG (W.). — Uber specifische in der Leberzellen nach Eiweisfutterung auftetrendre Gebilde. — **Anat. Anz.**, 42, 1912, p. 251.

224 BERG (W.). — Uber den mikroskopischen Nachweis der Eiweisspeicherung in der Leber. — **Bioch. Zeitsch.**, 61, 1914, p. 428-433.

225. BERG (W.). — Uber funktionnelle Leberstrukturen. — **Arch. f. mik. Anat.**, 94, 1920, p. 518.

226. BERG (W.). — Uber die Wirkung der Nuklealfärbung, besonders des partiellen Hydrolyse mit Normalsalzsäure auf histologische Objekte. — **Zeits. f. mik. anat. Forsch.**, 7, 1926, p. 421-460.

227. BERG (W.). — Uber den mikroskopischen Nachweis der Eiweisspeicherung in der Leber von grosseren einheimischen Haustieren... — **Zeits. f. mik. anat. Forsch.**, 30, 1932, p. 38-44.

228. BERG (W.). — Uber den mikroskopisch nachweisbaren Ubertritt von Stoffen aus dem Cytoplasma in den Kern der Leberzelle (Vermehrung der gelösten Stoffe vorstuffen der Kernkristalle, Glykogen und Fett in Kern). — **Zeits. f. mik. Anat. Forsch.**, 35, 1934, p. 146-180.

229. BERG (W.). — Uber Fett und Pigmenteinschlüsse in der Leber-

zellkerne den Menschen. — **Zeits. f. mik. Anat. Forsch.**, 38, 1935, p. 644-650.

230. BRACHET (J.). — Le rôle physiologique et morphogenétique du noyau. — **Act. Scient. Indust.**, Hermann, Paris, 1938.

231. BRACHET (J.). — La détection histochimique des acides pentosenucléiques. — **C. R. Soc. Biol.**, 133, 1940, p. 88-90.

232. BRACHET (J.). — La détection histochimique et le dosage des acides pentosenucléiques. — **Enzymol.**, 10, 1941, p. 87-96.

233. BRACHET (J.). — La localisation des acides pentosénucléiques dans les tissus animaux et les œufs d'amphibiens en voie de développement. — **Arch. Biol.**, 53, 1942, p. 207-257.

234. BRACHET (J.). — La spécificité de la réaction de Feulgen pour la détection de l'acide thymonucléique. — **Experientia**, 2, 1946, p. 142-143.

235. BRACHET (J.). — Embryologie chimique. — Masson, Paris, 1947.

236. BRACHET (J.). — Synthèse des protéines et ribonucléoprotéides. — **Exp. Ann. Bioch. médicale**, 12, 1950, p. 1-19.

237. BRACHET (J.). — Structure in relation to cellular function. The localization and the role of ribonucleic acid in the cell. — **Annals of N.-York Acad. of Sciences**, 50, 1950, p. 861-869.

238. BRACHET (J.). — Le rôle des acides nucléiques dans la vie de la cellule et de l'embryon. — **Act. Biochim.**, 16, 1952.

239. BRACHET (J.) et JEENER (R.). — Recherche sur des particules cytoplasmiques de dimensions macromoléculaires riches en acide pentosenucléique. — **Enzymol.**, 11, 1944, p. 196-212.

240. BRACHET (J.), JEENER (R.), ROSSEEL (M.) et THONET (L.). — Etude des variations de la teneur en acide ribonucléique du foie dans différents états physiologiques. — **Bull. Soc. Chim. Biol.**, 28, 1946, p. 460-464.

241. BORSOOK (H.), DEASY (C.-L.), HAAGEN-SMIT (A.-J.), KEIGHLEY (G.) et LOWY (P.-H.). — Incorporation of C14 labeled amionacids into proteins of fractions of guinea pig liver homogenate. — **Feder. Proc.**, 9, 1950, p. 154-155.

242 CAHN (T.) et BONOT (A.). — Démonstration de l'existence de protides de réserve dans le foie des mammifères. — **C. R. Ac. Sciences**, 185, 1928, p. 1212-1214.

243. CAHN (T.) et BONOT (A.). — Recherches sur les variations des équilibres des constituants cellulaires, variations au cours du jeune, variations des constituants de l'organisme entier, variations des constituants des organes. — **Ann. Phys. Physico-Chimie Biol.**, 4, 1928, p. 485-530.

244. CAMAIN (R.). — Cellules hépatiques à noyaux vacuolaires observées dans les cirrhoses tropicales. — **Réunion Méd. Chir. et Pharm. A. O. F.**, 26 juin 1952.

245. CAMPBELL (R.-M.) et KOSTERLITZ (H.-W.). — Ribonucleic acid as a constituent of labile liver cytoplasm. — **J. of Phys.**, 106, 1947, p. 12-13 P.

246. CASPERSSON (T.). — Uber den chemischen Aufbau der Strukturen des Zellkernes. — **Skand. Arch. f. Phys.**, 73, 1936, p. 1-151.

247. CASPERSSON (T.). — Studies on the nucleic acid metabolism during the cell cycle. — **Arch. Exp. Zellf.** 22, 1938, p. 265.

248 CASPERSSON (T.). — Die Eiweissverteilung in den Strukturen des Zellkerns. — **Chromosoma**, 1, 1940, p. 562-604.

249. CASPERSSON (T.). — « Chromosomin » and nucleic acids. — **Nature**, 159, 1944, p. 499.

250. CASPERSSON (T.). — Cell growth and cell function. A cytological study. — Norton, N.-York, 1950.

251. CASPERSSON (T.), LANDSTROEM-HYDEN (H.) et AQUILONIUS (L.). — Cytoplasm-nukleotide in Eiweissproduzieren drüsenzellen. — **Chromosoma**, 2, 1941, p. 111-131.

252. CASPERSSON (T.) et SCHULTZ (J.). — Nucleic acid metabolism of the chromosomes in relation to gene production. — **Nature**, 142, 1938, p. 294.

253. CASPERSSON (T.) et SCHULTZ (J.). — Ribonucleic acids in both nucleus and cytoplasm and the function of the nucleolus. — **Proc. Nat. Ac. Sc.**, 26, 1940, p. 507-515.

254. CAVALLERO (C.). — Nucleolar substance in the anterior lobe of the human pituitary gland. — **Arch. of Path.**, 44, 1947, p. 639-645.

255. CAZAL (P.). — La ponction-biopsie du foie. — Vigot, Paris, 1949.

256. CAZAL (P.) et MIROUZE (J.). — L'aspect histologique du foie au cours du diabète. Son intérêt théorique. — **Presse médicale**, 58, 1950, p. 1077-1079.

257. CAZAL (P.) et MIROUZE (J.). — Une anomalie mal connue des cellules hépatiques: les noyaux vacuolaires et leur signification physiopathologique probable dans le syndrome d'adaptation. — **Presse médicale**, 59, 1951, p. 571-573.

258. CHANTRENNE (H.). — Hétérogénéité des granules cytoplasmiques du foie de souris. — **Biochi. Biophy. Acta.**, 1, 1947, p. 437-448.

259. CHANTRENNE (H.). — Un modèle de synthèse peptidique, propriétés du benzoylphosphate de phényle. — **Biochi. Biophy. Acta.**, 2, 1948, p. 286-293.

260. CHEVREMONT (M.). — Contribution à l'étude des microsomes. — **Bull. Ac. Roy. Méd. Belg.**, 15, 1950, p. 29-39.

261. CHEVREMONT (M.) et FIRKET (H.). — La phosphatase alcaline dans les cellules cultivées **in vitro**. Ses rapports avec la croissance. — **Arch. de Biol.**, 4, 1949, p. 441-472.

262. CHIPPS (H.-D.) et DUFF (G. I.). — Glycogen infiltration of liver cell nucleus. — **Am. J. of Path.**, 18, 1942, p. 641.

263. CLARA (M.). — Gallensekretion oder Eiweisspeicherung? — **Zeits. f. Zellfors. mikr. Anat.**, 21, 1934, p. 119-133.

264. CLARA (M.). — Der Bau der Gallenkapillaren unter physiologischen und experimentellen Bedingungen, morphologische und experimentelle Untersuchungen an den kaninchen Leber. — **Zeits. mik. Anat. Forsch.**, 35, 1934, p. 1-56.

265. CLAUDE (A.). — Distribution of nucleic acids in cell and morphological constitution of cytoplasm. — **Biological Symposia**, 10, 1943, p. 111-129.

266. CLAUDE (A.). — Constitution of protoplasm. — **Science**, 97, 1943, p. 451-456.

267. CLAUDE (A.) et FULLAM (E.-F.). — The preparation of section of guinea-pig liver for electron microscopy. — **J. of Exp. méd.**, 83, 1946, p. 499-503.

268. CLAVERT (J.). — Modification des noyaux et de la basophilie de la cellule hépatique du pigeon sous l'action de la folliculine. — **C. R. Ass. Anat.**, 56, 1949, p. 121-128.

269. CLAVERT (J.), MANDEL (P.) et JACOB (M.). — Modifications histologiques du foie de rat pendant le jeune protéique prolongé et après réalimentation. — **C. R. Ac. Sc.**, 230, 1950, p. 1209-1210.

270. COUNCILMANN (W.-T.), MALLORY (F.-B.) et PEARCE (R.-H.). — A study of the bacteriology and pathology of two hundred and twenty fatal cases of diphteria. — **J. Boston Soc. Méd. Sc.**, 5, 1900, p. 139-318.

271. CROS (A.). — Contribution à l'étude de l'intoxication phalloïdienne expérimentale et humaine. — **Thèse Médecine** Montpellier, 1952, 27 p.

272. D'ANCONA (U.). — Sul polyploidismo delle cellule epatiche. — **Boll. della Soc. Ital. Biol. Sperl.**, 16, 1941, p. 49-50.

273. DANIELLI (J.-F.). — Cell physiology and pharmacology. — Elsevier, N.-York, 1950.

274. DANIELLI (J.-F.). — Cytochemistry. A critical approach. — Wiley, N.-York, 1953.

275. DAVIDSON (J.-N.). — The biochemistry of the nucleic acids. — Methuen, London, 1950.

276. DAVIDSON (J.-N.) et WAYMOUTH (Ch.). — Tissue nucleic acids; isolation and properties of liver ribonucleic acid. — **Bioch. J.**, 38, 1944, p. 375-379.

277. DAVIDSON (J.-N.) et WAYMOUTH (Ch.). — Histochemical demonstration of ribonucleic acid in mammalian liver. — **Proc. Roy. Soc. Edimb.**, 62, 1944, p. 96-98.

278. DAVIDSON (J.-N.) et WAYMOUTH (Ch.). — Nucleoproteins of liver cells demonstrated by ultra violet microscopy. — **J. Phys.**, 105, 1946, p. 191-196.

279. DEANE (H.-W.). — Cytological study of storage and secretion in developing liver of mouse. — **Anat. Rec.**, 88, 1944, p. 161-173.

280. DEANE (H.-W.). — A cytochemical survey of phosphatase in mammalian liver, pancreas, and salivary glands. — **Am. J. of Anat.**, 80, 1947, p. 321.

281. DE BRUX (J.) et MARCHAND (Ch.). — Etude sur le fonctionnement, la régénération et la cancérisation de la cellule hépatique. — **Presse Médicale**, 49, 1949, p. 704-705.

282. DEYSSON (G.). — Contribution à l'étude du syndrome mitoclasique. — **Thèse Pharmacie**, Paris, 1948.

283. DITTMAR (C.). — Uber Veränderung der Korpersubstanzen bei verschiedener Ernhärung und in Hungerzustand. — **Arch. f. Exp. Path. u. Pharmak.**, 171, 1933, p. 496-518.

284. EGER (W.) et KLARNER (Ch.). — Uber Glykogenbildung und Glykogenablagerung in der menschlichen Leber. — **Virchow's Archiv.**, 315, 1948, p. 135-146.

285. EHRLICH (P.). — Uber das Vorkommen von Glykogen in diabetischen und in normalen Organisms. — **Zeits. f. Klin. Med.**, 6, 1883, p. 33-46.

286. ELY (J.-O.) et ROSS (M.-H.). — Desoxynucleic content of rat liver nuclei influenced by diet. — **Science**, 114, 1951, p. 70-72.

287. ERIKSON (R.-O.), SAX (K.-B.) et OGUR (M.). — Perchloric acid in the cytochemistry of pentose nucleicacid. — **Science**, 110, 1949, p. 472-473.

288. FARBER (E.), KOCH-WESER (D.), SZANTO (P.-B.), POPPER (H.). — Correlation between cytoplasmic basophilia and the nucleic acid content of liver. — **Arch. of Path.**, 51, 1951, p. 339-408.

289. FENN (W.-O.). — Deposition of potassium and phosphate with glycogen in rat livers. — **J. Biol. Chem.**, 128, 1939, p. 297-307.

290. GAUTIER (C.) et THIERS (H.). — Augmentation du volume, du poids, et de l'azote total du foie sous l'influence d'une alimentation riche en azote. — **Bull. Soc. Ch. Biol.**, 10, 1928, p. 537-552.

291. GEREBTZOFF (M.-A.) et DALLEMAGNE (M.-J.). — Différenciation et multiplication massive de plasmocytes **in vivo** par un nouveau procédé expérimental. — **C. R. Ass. Anat.** 62, 1951, p. 207-212.

292. GILBERT (A.) et JOMIER (J.). — Structure de la cellule hépatique aux différents temps de la digestion et dans les divers régimes. — **Bull. et Mém. Soc. Anat. Paris,** 82, 1907, p. 313-319.

293. GLICK (D.). — Techniques of histo and cytochemistry. — Interscience, N.-York, 1951.

294. GORET (P.) et JOUBERT (L.). — Les nucléoprotéines et les acides nucléiques en biologie. — **Revue Immunol.,** 13, 1949, p. 338-387.

295. GRANEL (F.) et KHAU VAN KIEN (L.). — La valeur du thymus. — **Arch. Anat. Hist. Embr.,** 34, 1952, p. 211-216.

296. GROSS (W.). — Uber Eiweisspeicherung in der Leber. — **Verh. dtsch. path. Gesel.,** 21, 1926, p. 196-199.

297. HAUROWITZ (F.). — Biological problems and immunochemistry. **Quart. Rev. Biol.,** 24, 1949, p. 93-101.

298. HENRY (H.) et STACEY (M.). — Histochemistry of gram-staining reaction for microorganisms. — **Nature,** 151, 1943, p. 671.

299. HOERR (N.-L.). — Methods of isolation of morphological constituents of liver cells. — **Biol. Symp.,** 10, 1943, p. 185-231.

300. HOGEBOOM (G.-H.), SCHNEIDER (W.-C.) et PALLADE (G.-E.). — Cytological studies of mammalian tissues. Isolation of intact mitochondria from rat liver: some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. — **J. Biol. Chem.,** 172, 1948, p. 619-635.

301. HULTIN (T.). — Incorporation in vivo of 15N labeled glycine into liver fractions of newly hatched chicks. — **Exp. Cel. Res.,** 1, 1950, p. 376-381.

302. HUSEBY (R.-A.) et BARNUM (C.-P.). — Investigation of the phosphoruscontaining constituents of centrifugally prepared fractions from mouse liver cell cytoplasm. — **Arch. Bioch.,** 26, 1950, p. 187-198.

303. HYDEN (H.). — Die Funktion des Kernkorperchens bei der Eiweissbildung in Nervezellen. — **Zeits. f. mik. anat. Forsch.,** 54, 1944, p. 96-130.

304. HYDEN (H.). — Protein metabolism in nerv cell during growth and function. — **Acta Phys. Skand.,** 6 (supp. 17), 1943, p. 1-136.

305. HYDEN (H.). — Nucléoproteins in virus reproduction. — **Cold. Spring Harb. Symp. Quant. Biol.,** 12, 1947, p. 104-114.

306. JACOBSON (W.) et WEBB (M.). — The two types of nucleic acids during mitosis. — **J. of Phys.**, 1, 1951, p. 2-4 P.

307. JOSLIN (E.-P.). — The treatment of diabetes mellitus. — Lea Fibiger, Philadelphia, 1947.

308. KARAMITZAS (J.). — Uber das Vorkommen von Glykogen in den Kernen von Leberzellen. — **Zeits. f. Ges. Exp. Med.**, 194, 1908, p. 439-446.

309. KELLER (E.-B.). — Turnover of proteins of cell fractions of adult rat liver in vivo. — **Feder. Proc.**, 10. 1951, p. 206.

310. KLEMPERER (P.), GUEFT (B.), LEE (S.-L.), LEUCHTENBERGER (C.) et POLLISTER (A.-W.). — Cytochemical changes of acute lupus erythemathosus. — **Arch. of Path.**, 5, 1950, p. 503-516.

311. KOIRANSKI (E.). — Uber ergentümliche Gebilde in den Leberzellen der Amphibien. — **Anat. Anz.**, 25, 1904, p. 435-456.

312. KOSSEL (A.) et HOPPE-SEYLER (F.). — Zur chemie des Zellkerns. — **Zeits. phys. Chem.**, 7, 1882-83, p. 7-22.

313. KOSTERLITZ (H.-W.). — Effect of dietary protein on liver cytoplasm. — **Nature**, 1511, 1944, p. 207-208.

314. KOSTERLITZ (H.-W.). — Effect of changes in dietary protein in composition and structure of liver cell. — **J. Physiol.**, 106, 1947, p. 194-210.

315. KOSTERLITZ (H.-W.) et CAMPBELL (R.-M.). — The effect of diets deficient in tryptophan, lysin and calorific value on the liver cytoplasm of rats. — **J. Physiol.**, 104, 1945, p. 16 P.

316. KOSTERLITZ (H.-W.) et CRAMB (I.-D.). — The effect of fasting on the protein content of the liver. — **J. Physiol.**, 102, 1943, p. 18 P.

317. KRARUP (N.-B.) et IVERSEN (P.). — Hepatomegaly in diabetes mellitus. — **Acta Med. Scand.**, 105, 1940, p. 433-440.

318. KRAUSE (R.). — Beitrage zur Histologie der Wirbelthierleber. — **Arch. mikr. Anat.**, 62, 1893, p. 53-83.

319. KREMER (J.). — **Anat. Anz.**, 75, Eng. heft, 1932, p. 132.

320. KREMER (J.). — Die morphologische Gestaltung den Gallensekretion. — **Zeits. f. mik. anat. Forsch.**, 33, 1933, p. 485-524.

321. KURNICK (N.-B.). — The quantitative estimation of desoxyribonucleic acid based on methylgreen staining. — **Exp. Cell. Res.**, 1, 1950, p. 151-158.

322 LAGERSTEDT (S.). — Gallocyanin staining as specific method for production of protein inclusions in liver cells. — **Acta Anat.**, 2, 1947, p. 392-400.

323. LAGERSTEDT (S.). — Investigations on proteinaceous inclusions of liver cell cytoplasm in ultraviolet light. — **Acta Anat.**, 3, 1947, p. 84-94.

324. LAGERSTEDT (S.). — Cytological studies on the protein metabolism of the liver in rat. — **Acta Anat.**, 7 (suppl. 9), 1949, p. 1-116.

325. LAMOTTE (M.) et LAMOTTE-BARRILLON (S.). — Le glycogène hépatique, sa régulation pituitaire et corticale. Les glycogénoses. — **Revue Intern. Hépat.**, 2, 1952, p. 43-113.

326. LANDSTROEM (H.), CASPERSSON (T.) et WOHLFART (G.). — Uber den Nukleotidumsatz der Nervenzelle. — **Zeits. f. mik. anat. Forsch.**, 49, 1941, p. 534-548.

327. LANGERON (M.). — Précis de Microscopie, Masson, Paris, 1949.

328. LEE (C.-S.) et TSUBOI (K.-K.). — Histochemical and microchemical studies of rat liver after low protein diet and p. dimethylamino-azobenzène. — **Am. J. of Path.**, 4, 1949, p. 798-800.

429. LEONARD (A.). — **Arch. f. Anat. u. Physio.** Abt. suppl., 1884.

330. LEUCHTENBERGER (C.). — A cytochemical study of picnotic nuclear degeneration. — **Chromosoma**, 3, 1950, p. 449-473.

331. LEUCHTENBERGER (C.), HIMES (M.) et POLLISTER (A.-W.). — Effect of thymonucleo depolymérase and acid hydrolysis on methylgreen staining of chromatin. — **Anat. Rec.**, 105, 1949, p. 107.

332. LEVENE (P.-A.), MIKESKA (L.-A.) et MORI (T.). — On the carbohydrate of thymonucleic acid. — **J. Biol. Chem.**, 85, 1930, p. 785-787.

333. LI (H.-M.). — Untersuchungen uber die Eiweisspeicherung in der Leber. — **Chinese J. Physiol.**, 10, 1936, p. 7-26.

334. LISON (L.). — Histochimie animale. Méthodes et problèmes. — Gauthier Villars, Paris, 1936.

335. LISON (L.) et MUTSAARS (W.). — Metachromasy of nucleic acids. — **Quart. J. of Micros. Sc.**, 14, 1950, p. 309-313.

336. LISON (L.) et PASTEELS (J.). — L'évolution de l'acide désoxyribonucléique dans la mitose somatique. — **C. R. Ass. Anat.** 63, 1951, p. 323-328.

337. LOUBATIERES (R.). — Mitogenèse dans des cellules hépati-

ques au voisinage d'un néo du sein. — **Revue Foie, 9**, 1950, p. 49-52.

338. LUCK (J.-M.). — Liver protein, question of protein storage. — **J. Biol. Chem.**, 115, 1936, p. 491-510.

339. MAC BRIDE (J.-J.). — Liver glycogenesis and fasting in rat, effect of glucose feeding on water balance. — **J. Biol. Chem.**, 147, 1943, p. 333-339.

340. MACH (R.-S.) et MACH (E.). — Les effets métaboliques de la cortisone et de l'A. C. T. H. — **Exp. Ann. Bioch. Méd.**, 13, 1951, p. 1-16.

341. MAC KAY (E.-M.) et BERGMAN (H.-C.). — Amount of water stored with glycogen in liver. — **J. Biol. Chem.**, 105, 1934, p. 59-62.

342. MAC KAY (D.) et FARRAR (J.-T.). — Basophilic substance in human liver cells. — **Cancer**, 1, 1950, p. 106-115.

343. MAC MAHON (H.-E.). — Uber die physiologische und pathologische Teilung von Kern und Zelle in Leber épithelien. — **Zeits. f. Mik. Anat. Forsch.**, 32, 1933, p. 413-443.

344. MANDEL (P.). — Sur les acides pentose et désoxypentose-nucléique des tissus. — **Exp. Ann. Bioch. Méd.**, 13, 1951, p. 255-284.

345. MANDEL (P.), CLAVERT (J.) et MANDEL (L.). — Effets de la folliculine sur les diverses fractions protéiques du plasma chez le pigeon. — **C. R. Soc. Biol.**, 141, 1947, p. 678-680.

346. MANDEL (P.), JACOB (M.) et MANDEL (L.). — Etude sur le nombre de noyaux hépatiques au cours de l'inanition protéique prolongée. — **C. R. Ac. Sc.**, 229, 1949, p. 1370-71.

347. MANDEL (P.), JACOB (M.) et MANDEL (L.). — L'acide désoxypentose nucléique constante tissulaire. — **J. Physiol.**, 42, 1950, p. 662-664.

348. MANDEL (P.), JACOB (M.) et MANDEL (L.). — Etudes sur le métabolisme des acides nucléiques. I. Action du jeune protéique prolongé sur les deux acides nucléiques du foie, du rein et du cerveau. — **Bull. Soc. Ch. Biol.**, 32, 1950, p. 80-88.

349. MANDEL (P.) et MANDEL (L.). — Variations de certains constituants chimiques du foie de pigeon sous l'effet de la folliculine. Phosphore protéique et nucléique. — **C. R. Soc. Biol.**, 142, 1948, p. 706-708.

350. MANDEL (P.), MANDEL (L.) et JACOB (M.). — Sur le comportement comparé au cours du jeune protéique prolongé des deux acides nucléiques des tissus animaux et sur sa signification. — **C. R. Ac. Sc.**, 226, 1948, p. 2019-2021.

351. MARCHAND (Ch.). — Contribution à l'étude des acides nucléiques dans l'histophysiologie et l'histopathologie hépatiques. — **Thèse Médecine,** Paris, n. 442, 1950.

352. MARINESCO (G.). — La cellule nerveuse. — Doin, Paris, 1909.

353. MARTIN (J.-F.), MALLET-GUY (P.), FEROLDI (J.) et EICHOLZ (L.). — Contribution à l'étude histopathologique des ictères par hépatite. 2. Les ictères chroniques. — **J. Médecine Lyon,** 771, 1952, p. 149-185.

354. MAYER (A.), RATHERY (F.) et SCHAEFFER (G.). — Les granulations ou mitochondries de la cellule hépatique. — **J. Phys. Path. Gén.,** 16, 1914, p. 581-622.

355. MEITES (M.). — Etude de la pycnose provoquée par les narcotiques. Application de la réaction nucléale de Turchini. Castel et Khau Van Kien. — **Montpellier Médical,** 25, 1944, p. 283-284.

356. MEIXNER. — Mikroskopischer Glykogennachweis. — **Mchn. Med. Wochensch.,** 53, 1906, p. 2175.

357. MICHAELIS (L.). — The nature of the interreaction of nucleic acids and nuclei with basic dyestoffs. — **Cold. Spr. Har. Symp. Quant. Biol.,** 12, 1947, p. 131-142.

358. MILLER (S.-P.). — Anatomy and histology of the liver. — London, 1916.

359. MIROUZE (J.). — Le foie diabétique. Aspects hormonaux. — Exp. Sc. Fr. Paris, 1951.

360. MOYSON (F.). — Etude des modifications morphologiques et fonctionnelles du foie dans les états post-traumatiques. — **Act. Med. Belg.,** 1952, 65 p.

361. NOEL (R.). — Sur l'état binucléé de la cellule hépatique. — **C. R. Soc. Biol.,** 88, 1952, p. 212-214.

362. NOEL (R.). — Recherches histophysiologiques sur la cellule hépatique des mammifères. — **Thèse Sciences,** Paris, 1923, et **Arch. Anat. Micr.,** 9, 1923, p. 1-158.

363. OPIE (E.-L.). — Mobilisation of basophilic substance (ribonucleic acid) in the cytoplasm of liver cell with the production of tumors by butter yellow. — **J. of Exp. Med.,** 84, 1946, p. 91-107.

364. OPIE (E.-L.). — Normal structure and degenerative changes of the cytoplasm of liver cell and of tumor cells derived from them. — **J. of Exp. Med.,** 85, 1947, p. 339-346.

365. OPIE (E.-L.). — Cytochondria of normal cells of tumor cells and of cells with various injuries. — **J. of Exp. Med.,** 86, 1947, p. 45-54.

366. OPIE (E.-L.) et LAVIN (G.-I.). — Localization of ribonucleic

acid in the cytoplasm of liver. — **J. of Exp. Med.**, 84, 1946, p. 107.

367. PASCHKIS (K.). — Uber das Reserveeiweiss der Leber. Einfluss of Insulin und anderen Hormonen. — **Klin. Wochensch.**, 8, 1929, p. 1293-1297.

368. PASTEELS (J.) et LISON (L.). — Teneur des noyaux en acide desoxyribonucléique dans différents tissus chez le rat. — **C. R. Ac. Sc.**, 230, 1950, p. 780-782.

369. PHISALIX (C.). — Recherches embryologiques histologiques et physiologiques sur la glande à venin de la Salamandre terrestre. — **Thèse Médecine**, Paris, 1900.

370. PICARD (O.). — Anomalies nucléaires et perturbations mitotiques de l'épithélium utérin chez la femelle. Rôle possible des oestrogènes. — **Bull. Hist. Appl.**, 26, 1949, p. 199-220.

371. PICARD (P.). — Action de l'éther et du chloroforme sur la structure de la cellule végétale. — **Thèse Pharmacie** Paris, 14, 1933.

372. POLLISTER (A.-W.). — Quelques méthodes de cytologie chimique quantitative. — **Revue Hémat.**, 5, 1950, p. 527-554.

373. POLLISTER (A.-W.) et LEUCHTENBERGER (C.). — The nature of the specificity of methylgreen for chromatin. — **Proc. Nat. Ac. Sc.**, 35, 1949, p. 111-116.

374. POLLISTER (A.-W.) et RIS (H.). — Nucléoprotein determination in cytological preparations. — **Cold. Spr. Har. Symp. Quant. Biol.**, 12, 1947, p. 147-157.

375. POLONOVSKI (M.) et DELBARRE (F.). — Les protéines de Bence-Jones. — **Exp. Ann. Bioch. Méd.**, 12, 1951, p. 256-301.

376. POPPER (H.), DE LA HUERGA (J.), STEIGMAN (F.), SLODKI (M.). — Turbidimetric gamma-globulin determination in hepatobiliary disease. — **J. Labor. Clin. Med.**, 35, 1950, p. 391-402.

377. POUYET (J.). — L'acide chlorhydrique succédané de la ribonucléase dans l'élimination spécifique de l'acide ribonucléique chez les cellules des êtres supérieurs aussi bien que des bactéries. Aspect chimique de la question. — **C. R. Ac. Sc.**, 228, 1949, p. 608-610.

378. PRENANT (A.), BOUIN (P.) et MAILLARD (L.). — Traité d'Histologie. Schleicher, Paris, 1904.

379. RATHERY (F.). — Le diabète sucré. — Baillière, Paris, 1934-36.

380. RICH (A.-R.) et BERTHRONG (M.). — Evidence for the presence of ribonucleic acid in the cytoplasmic bodies that appaer in the hepatic and adrenal épithelial cells of man in acute infection. — **Bull. J. Hopk. Hosp.**, 85, 1949, p. 327-343.

381. ROBERTS (S.) et WHITE (A.). — Studies on the origin of the serum proteins. — **J. Biol. Chem.**, 180, 1949, p. 505.

382. ROTHMAN (H.). — Eiweisspeicherung in der Leber bei Eiweissmast und ihre Beeinflussung durch Adrenalin. — **Zeits. f. Ges. Exp. Med.**, 40, 1924, p. 255-260.

383. RUMGANTSEW (A.-V.). — Structure du noyau dans l'insuffisance protéique prolongée. — **Arch. Path. Moscow.**, 11, 1949, p. 48-52.

384. SACK (A.). — Uber vakuolisierte Kerne der Fettzellen. — **Arch. mikr. Anat.**, 46, 1895, p. 430-478.

385. SCHMAUS (H.) et ALBRECHT (E.). — Zur funktionnellen Struktur der Leberzelle. — **Festschrift f. Kupffer**, Iéna, 1899.

386. SEITZ (W.). — Die Leber als Vorrathskammer für Eiweisstoffe. — **Arch. f. Ges. Phys.**, 111, 1906, p. 309-334.

387. SERRE (M.) et CAZAL (P.). — Les phénomènes de lysoplasie dans l'hépathonéphrite phallo.dienne. — **Rev. Mal. Foic**, 16, 1943, p. 109-117.

388. SESHACHAR (B.-R.) et FLICK (E.-W.). — Application of perchloric acid technique to Protozoa. — **Science**, 110, 1949, p. 659.

389. SIBATANI (A.). — Some distincts types of distribution of cytoplasmic ribonucleic acid with related change of cytochondria in liver cell under normal and pathological conditions. — **Cytologia**, 14, 1949, p. 187-203.

390. STICH (H.). — Das Vorkommen von Ribonucleinsaüre in Kernsaft und spindel sich teilender Kerne von **Cyclops strenuus**. — **Zeits. Naturforsch.**, 66, 1951, p. 259-261.

391. STOWELL (R.-E.). — Nucleic acid and cytologic changes in regenerating rat liver. — **Arch. Path.**, 46, 1948, p. 164-178.

392. STOWELL (R.-E.) et LEE (C.-S.). — Histochemical studies of mouse liver after single feeding of carbontetrachlorid. — **Av. of Path.**, 5, 1950, p. 519-537.

393. STUBEL (H.). — Die Wirkung des Adrenalins auf das in der Leber gespeicherte Eiweiss. — **Arch. f. Ges. Phys.**, 185, 1920, p. 74-85.

394. SULKIN (N.-M.). — A study of the nucleus in the normal and hyperplastic liver of the rat. — **Am. J. of Anat.**, 73, 1950, p. 107-125.

395. SWIFT (H.-M.). — The desoxyribonucleic acid content of animal nuclei. — **Physiological Zool.**, 3, 1950, p. 169-198.

396. SZANTO (P.) et POPPER (H.). — Basophilic cytoplasmic material (pentose nucleic acid). Distribution in normal and

abnormal human liver. — **Arch. of Path.**, 51, 1951, p. 409-422.

397. TICHMENEFF (L.). — Uber Eiweisspreicherung in der Leber. — **Bioch. Zeitsch.**, 59, 1914, p. 326.

398. TURCHINI (J.). — Du rôle du nucléole dans l'histophysiologie cellulaire. — **Bull. Ac. Sc. Lettres Montpellier**, 60, 1931, p. 30.

399. TURCHINI (J.), CASTEL (P.) et KHAU VAN KIEN (L.). — Une nouvelle coloration nucléaire. Coloration cytologique des noyaux par une fluorone. — **Montpellier Médical**, 23, 1943, p. 440.

400. TURCHINI (J.) et KHAU VAN KIEN (L.). — A propos de la localisation des acides nucléiques dans la cellule nerveuse et de la constitution du nucléole et des corps de Nissl. — **C. R. Ass. Anat.**, 59, 1950, p. 671-679.

401. TURCHINI (J.) et MEITES (M.). — Mécanisme histophysiologique du déclenchement sécrétoire dans le foie. Action de l'hypophyse sur le chondriome et sur l'appareil de Golgi hépatiques. — **C. R. Soc. Biol.**, 137, 1943, p. 510-512.

402. VAN HERWEDEN (M.-A.). — Uber die Nucleasewirkung auf tierische Zellen. Ein Beitrag zur chromidien Frage. — **Arch. f. Zellforsch.**, 10, 1913, p. 431.

403. VENDRELY (C.). — Contribution à l'étude cytochimique des acides nucléiques de quelques organites cellulaires. — **Arch. Anat. Hist. Embr.**, 33, 1951, p. 81-112.

404. VENDRELY-RANDAVEL (C.). — L'acide chlorhydrique succédané de la ribonucléase dans les localisations de l'acide ribonucléique chez les cellules des êtres supérieurs aussi bien que chez les bactéries. Aspect histologique de la question. — **C. R. Ac. Sc.**, 228, 1949, p. 606-608.

405. VENDRELY-RANDAVEL (C.). — Sur la présence d'acide ribonucléique au niveau de chondriome. — **Acta Anat.**, 7, 1949, p. 225-233.

406. VENDRELY (C.) et VENDRELY (R.). — L'acide ribonucléique des mitochondries et des microsomes du foie et ses variations au cours du jeune protéique. — **C. R. Ac. Sc.**, 230, 1950, p. 333-335.

407. VENDRELY (R.) et VENDRELY (C.). — Nouveaux résultats sur la teneur absolue en acide désoxyribonucléique du noyau cellulaire, cas particulier des érythrocytes d'oiseaux. — **C. R. Ac. Sc.**, 228, 1949, p. 1256-1258.

408. VENDRELY (R.) et VENDRELY (C.). — Sur la teneur absolue en acide désoxyribonucléique du noyau cellulaire chez

quelques espèces d'Oiseaux et de Poissons. — **C. R. Ac. Sc.**, 230, 1950, p. 670-671.

409. VERCAUTEREN (R.). — Signification cytochimique de la coloration de Unna-Pappenheim. — **Arch. Int. Phys.**, 2, 1949, p. 214-219.

410. VERCAUTEREN (R.). — The structure of desoxyribonucleic acid in relation to the cytochemical signifiance of the methyl-green pyronin staining. — **Enzymologia**, 14. 1950, p. 134-140.

411. VIGIER (P.). — Note sur le rôle du nucléole dans la sécrétion. — **C. R. Soc. Biol.**, 52, 1900, p. 446.

412. VIGIER (P.). — Le nucléole. Morphologie. Physiologie. — **Thèse Médecine**, Paris, 614, 1900.

413. VOGT (C.) et VOGT (O.). — Lebengeschichte Funktion und Taetigkeitsregulierung des Nucleolus. — **Artz. Forsch.**, 1. 1947, p. 8-14 et 43-50.

414. WALTHARD (B.). — Die Entschung und Bedeutung des Kernglykogens der Leber. — **Schw. Med. Wochensc.**, 68, 1938, p. 866-867.

415. WARASI (W.). — Uber das Resereiweiss in der Leber. — **Zeisch. f. d. Ges. Exp. Med.**, 66, 1929, p. 436-441.

416. WARREN (S.). — The pathology of diabetes mellitus. — Philadelphia, 1938.

417. WARTER (J.), MANDEL (P.), METAIS (P.) et TOUILLIER (J.). — Sur une relation possible entre l'hypo-albuminémie et la teneur du foie en acide ribonucléique au cours des hépatites. — **Congrès Fr. Médecine**, 27, Genève, 1949; comm. 110-115.

418. WETZEL (R.-A.), WOLLSCHITT (H.), RUSKA (H.) et OESTREICHER (T.). — Uber den Eiweiss, Fett, und Kohlehydratstoffwechsel der weissen Ratte Normaltiere. — **Arch. Exp. Path. Pharmak.**, 179, 1935, p. 86-114.

419. WIAME (J.-M.). — The metachromatic reaction of hexametaphosphate. — **J. of Amer. Chem. Soc.**, 69, 1947, p. 3146-3147.

420. WILSON (J.-W.) et LEDUC (E.-V.). — The occurence and formation of binucleate and multinucleate cell and polyploid nuclei in the mouse liver. — **Am. J. of Anat.**, 82, 1948, p. 353-392.

421. WILSON (J.-W.) et LEDUC (E.-V.). — Abnormal mitosis in mouse liver. — **Am. J. of Anat.**, 86, 1950, p. 51-73.

422. ZIMMERMAN (H.-S.), MAC MURRAY (F.-G.), RAPPAPORT (H.) et ALPERT (L.-S.). — Studies of the liver in dia-

betes mellitus. 1. Structural and functionnal abnormalities. — **J. Labor. Clin. Med.**, 36, 1950, p. 912-921.

423. ZIMMERMAN (H.-S.), MAC MURRAY (F.-G.), RAPPAPORT (H.) et ALPERT (H.-S.). — Studies of the liver in diabetes mellitus. 2. Significance of fatty metamorphosis and its correlation with insulin sensitivity. — **J. Labor. Clin. Med.**, 36, 1950, p. 922-928.

424. ZOLLINGER (H.-U.). — Les mitochondries. Leur étude à l'aide du microscope à contraste de phase. — **Le Sang**, 5, 1950, p. 696-745.

# TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION . . . . . 7

1re PARTIE. — LE TISSU HÉPATIQUE : SA STRUCTURE : SES FONCTIONS. . . . . 13

I. — HISTOMORPHOLOGIE . . . . . 13

II. — HISTOCHIMIE . . . . . 20

III. — HISTOPHYSIOLOGIE . . . . . 24

2me PARTIE. — RECHERCHES HISTOCHIMIQUES SUR LE FOIE HUMAIN NORMAL ET PATHOLOGIQUE . . . . . 27

PROTOCOLE EXPERIMENTAL GENERAL . . . . . 27

*CHAPITRE PREMIER*

HISTOCHIMIE DES PHOSPHATASES HEPATIQUES 31

A) *Intérêt de cette étude* . . . . . 31

B) *Aperçu biochimique sur les phosphatases* . . . . . 33

C) *Techniques histochimiques de détection des phosphatases* . . . . . 37

D) *Histotopochimie des phosphomonoestérases hépatiques* . . . . . 55

1. Etudes antérieures . . . . . 55

2. Résultats personnels sur la phoephatase alcaline du foie humain normal et pathologique . . . . . 57

3. Résultats personnels sur la phosphatase acide du foie humain normal et pathologiqeu . . 74

E) *Conclusions* . . . . . 86

*CHAPITRE II*

HISTOCHIMIE DES NUCLEOPROTEINES ET DES ACIDES NUCLEIQUES HÉPATIQUES . . . . . 89

A) *Intérêt de cette étude* . . . . . 89

B) *Aperçu biochimique sur les nucléoprotéines et les acides nucléiques* . . . . . 91

C) *Techniques histochimiques de détection des nucléoprotéines et des acides nucléiques* . . . . . 95

D) *Histotopochimie des nucléoprotéines et des acides nucléiques hépatiques* . . . . . 105

1. Historique . . . . . 105

2. Recherches histochimiques personnelles sur les nucléoprotéines et les acides nucléiques hépatiques . . . . . 114

a) Foie humain normal . . . . . 114

b) Foies humains pathologiques . . . . . 162

E) *Conclusions* . . . . . 165

3me PARTIE. - CONSIDÉRATIONS HISTOPHYSIOLOGIQUES ET HISTOPHYSIOPATHOLOGIQUES ..... 165

*CHAPITRE PREMIER*

ORIGINE DES PHOSPHATASES SERIQUES ET DES HYPERPHOSPHATASEMIES DANS LES MALADIES DU FOIE ..... 168

A) *Phosphatasémie acide* ..... 169

B) *Phosphatase alcaline sérique et hyperphosphatasémie alcaline dans les maladies du foie* .... 170

*CHAPITRE II*

LES PHOSPHATASES ET LE METABOLISME DES ACIDES NUCLEIQUES HEPATIQUES ..... 176

A) *Métabolisme des désoxyribonucléoprotéines* .... 177

B) *Métabolisme des ribonucléoprotéines* ..... 180

C) *Les ribonucléoprotéines et la synthèse des protéines* ..... 184

D) *Les ribonucléoprotéines et le métabolisme de la cellule hépatique pathologique* ..... 188

E) *Métabolismes des nucléoprotéines et nucléoles vacuolaires* ..... 190

F) *Ribonucléoprotéines Kupfferiennes et gamma globulines* ..... 195

*CHAPITRE III*

LES PHOSPHOMONOESTERASES DANS DIVERS METABOLISMES HEPATIQUES ..... 198

A) *Metabolisme glucidique hépatique* ..... 198

B) *Métabolisme hépatique des lipides* ..... 201

CONCLUSIONS ..... 202

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES ..... 205

BIBLIOGRAPHIE ..... 240

# SERMENT

*En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Être suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ! Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !*

En ma qualité de Censeur de tour, j'ai lu la thèse ayant pour titre :

**Recherches Histochimiques et Histophysiologiques sur le Foie Humain normal et pathologique prélevé par ponction-biopsie,**

par Jean MACARY.

Je pense que la Faculté peut en permettre l'impression.

Montpellier, le 8 juin 1952.

*Le Professeur,*

P PAGÈS.

Vu :

Montpellier, le 9 juin 1952.

*Le Doyen,*

G GIRAUD.

Vu et permis d'imprimer :

Montpellier, le 11 juin 1952.

*Le Recteur,*

P. GUILLON.

---

La Faculté de Médecine de Montpellier déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leur auteur ; qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.